

Том 28, № 3. С. 343-878

2025

Официальный журнал
Российского Научного Общества Иммунологов

РОССИЙСКИЙ ИММУНОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ



RUSSIAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY

Official Journal
of Russian Society of Immunology

Volume 28
Number 3

2025

РОССИЙСКОЕ НАУЧНОЕ ОБЩЕСТВО ИММУНОЛОГОВ
(РНОИ)

РОССИЙСКИЙ ИММУНОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

июль-сентябрь

2025, том 28

№. 3

Основан в 1996 году

Главный редактор

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

Заместители главного редактора

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

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

Редакционная коллегия

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Руденский Александр – Медицинский Институт Говарда Хьюза, Чеве 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

Хайтов Муса Рахимович – доктор медицинских наук, профессор, академик РАН, директор «НЦ 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 «НЦ Институт иммунологии» ФМБА России, Москва, Россия

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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, академик 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 14.08.2025 г. Формат 60 x 90 1/8. Печать офсетная.

Усл. печ. л. 67. Тираж 2000 экз. (1-й завод – 1000 экз.)

Заказ № 061

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

July-September

2025, volume 28

No. 3

Published since 1996

Editor-in-chief

Valery A. Chereshevnev – 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

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

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

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

Alexander V. Karaulov – MD, PhD, Prof., RAS Full Member, 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. Khaltov – MD, PhD, Professor, RAS Full Member, Director, State Scientific Center "Institute of Immunology", FMBA of Russia, Moscow, Russian Federation

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Managing Editors:

Anna Rizopulu, PhD (Biology) (Moscow)

Natalia Rakitianskaia, (St. Petersburg)

E-mail: rusimmun@gmail.com

Translation editor:

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 Allegology and Immunology, RUDN University, Moscow, Russian Federation

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

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

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

Ludmila P. 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 Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

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

Oksana A. Svitich – MD, PhD, Professor, RAS Full Member, Director, I.I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera RAMS, Moscow, Russian Federation

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

Aleksey V. Tutelyan – PhD, MD (Medicine), Professor, RAS Full 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 14.08.2025. Print format 60 x 90 1/8. Offset printing.

Printed sheets 67. Circulation 2000 copies. (1st edition – 1000 copies.)

Print in LLC «ARTEMIDA»

199178, Russian Federation, St. Petersburg, 8 line of Vasilievsky Island, 831-1A

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

Бердюгина О.В.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ВОЗМОЖНОСТЕЙ ИСКУССТВЕННОГО ИНТЕЛЛЕКТА В ИММУНОЛОГИИ: ОТ ОБЗОРА ЛИТЕРАТУРЫ ДО СТАТИСТИЧЕСКОЙ ОБРАБОТКИ И АНАЛИЗА ПОЛУЧЕННЫХ ДАННЫХ..... 355

Сайдакова Е.В.

НОВЫЙ ПОДХОД К АНАЛИЗУ КЛЕТОЧНОГО ЦИКЛА Т-ЛИМФОЦИТОВ МЕТОДОМ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ..... 363

Глебездина Н.С.

БЕЛКИ-МИШЕНИ МЕЛАТОНИНА: ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ И ФУНКЦИИ..... 369

Куклина Е.М., Данченко И.Ю., Байдина Т.В.

МЕЛАТОНИНОВЫЕ РЕЦЕПТОРЫ MT1/MT2 В ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ Т-ХЕЛПЕРНЫХ ПОПУЛЯЦИЯХ..... 375

Эрдынеева Д.Б., Никифоров Н.Г., Верховая С.С., Орехов А.Н., Кулагова Т.А.

ВЛИЯНИЕ ЦИТОКИНОВ НА ТОЛЕРАНТНОСТЬ МАКРОФАГОВ К ЛИПОПОЛИСАХАРИДУ..... 381

Некрасова И.В., Логинова О.А., Орлова Е.Г.

ВЛИЯНИЕ ЭСТРИОЛА НА ПРОЛИФЕРАТИВНУЮ АКТИВНОСТЬ РЕГУЛЯТОРНЫХ СУБПОПУЛЯЦИЙ ТИМОЦИТОВ..... 387

Николенко М.В., Костоломова Е.Г., Сивкова Д.С., Борисенко А.И., Барышникова Н.В., Малишевская О.И., Васева Е.М., Приходько Ю.С.

КУЛЬТУРА МОНОЦИТОВ КАК МОДЕЛЬ ДЛЯ ТЕСТИРОВАНИЯ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ КОМПОЗИЦИЙ *IN VITRO*..... 393

Забокрицкий Н.А.

ИММУНОФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ОЦЕНКИ НОВОГО БИОСОЕДИНЕНИЯ..... 399

Сухих А.А., Жукова Д.С., Карал-оглы Д.Д., Клоц И.Н., Злобина А.П., Акулов А.П., Терещенко В.П., Рыбцов С.А.

ОСОБЕННОСТИ СТАРЕНИЯ КРОВИ ЯВАНСКИХ МАКАК..... 403

Гейн С.В., Полюдова Т.В., Ибатуллин М.В.

ВЛИЯНИЕ БАКТЕРИОЦИНОВ НА ФУНКЦИИ КЛЕТОК ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА *IN VIVO* И *IN VITRO*..... 409

Масленникова И.П.

ВЛИЯНИЕ БАКТЕРИЙ БИОПЛЕНК УРЕС И ИХ СУПЕРНАТАНТОВ НА СЕКРЕЦИЮ МИЕЛОПЕРОКСИДАЗЫ И КАТЕПСИНА G НЕЙТРОФИЛАМИ И МОНОНУКЛЕАРАМИ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА..... 415

Попова Л.П., Кузьмин М.Д., Карташова О.Л.

АНТИЦИТОКИНОВАЯ АКТИВНОСТЬ МИКРООРГАНИЗМОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ БАКТЕРИАЛЬНОМ ПРОСТАТИТЕ..... 421

Королевская Л.Б., Шмагель К.В.

ПРЕКУЛЬТИВИРОВАНИЕ КЛЕТОК, ПОДВЕРГАВШИХСЯ ДЛИТЕЛЬНОЙ КРИОКОНСЕРВАЦИИ, НЕГАТИВНО ВЛИЯЕТ НА ПРОЛИФЕРАТИВНУЮ АКТИВНОСТЬ Т-ЛИМФОЦИТОВ..... 425

Кольберг Н.А., Мухлынина Е.А., Кобелев Ю.Г., Данилова И.Г.

ВЛИЯНИЕ ЭКСТРАКТА ФАБРИЦИЕВОЙ БУРСЫ ПТИЦ НА ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ КРОВИ МЫШЕЙ ЛИНИИ C57BL/6 С ЦИКЛОФОСФАМИД-ИНДУЦИРОВАННЫМ ИММУНОДЕФИЦИТОМ..... 431

Бедулева Л.В., Фомина К.В., Меньшикова Д.И., Терентьева О.С., Юшков Д.П.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МОДЕЛЬ СИНДРОМА ШЕГРЕНА, СОПРОВОЖДАЮЩЕГОСЯ Т-ЛИМФОЦИТОПЕНИЕЙ..... 437

Иванов П.В., Сидоров А.Ю., Терентьев А.С., Черепанов И.С.

РЕГУЛЯТОРНЫЙ РЕВМАТОИДНЫЙ ФАКТОР В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МОДЕЛИ СИНДРОМА ШЕГРЕНА У КРЫС..... 443

Кряжевских А.В., Абишева Н.Н.

РЕГУЛЯТОРНЫЙ РЕВМАТОИДНЫЙ ФАКТОР В КРОВИ КРЫС, ИММУНИЗИРОВАННЫХ АУТОЛОГИЧНЫМИ ЛИМФОЦИТАМИ, АКТИВИРОВАННЫМИ *IN VITRO* ГЕТЕРОЛОГИЧНЫМИ ЛИМФОЦИТАМИ..... 449

Среднева Л.А., Султанова Т.Р.

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ВЛИЯНИЯ АЛЬФА-ЛИПОВОЙ КИСЛОТЫ И АМИНОДИГИДРОФАЛАЗИНДИОНА НАТРИЯ НА ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ СТАРЫХ КРЫС С ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫМ ДИАБЕТОМ..... 455

Соколова К.В., Туканов Д.А.

ИЗОФЛАВОНЫ КРАСНОГО КЛЕВЕРА (*TRIFOLIUM PRATENSE*) СНИЖАЮТ ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС В СЕЛЕЗЕНКЕ И ПЕЧЕНИ КРЫС С ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫМ ДИАБЕТОМ 2-ГО ТИПА..... 461

Овчинина Н.Г., Уракова М.А., Брындина И.Г., Секунов А.В., Протопопов В.А.

ВЛИЯНИЕ ЛЕКАРСТВЕННОГО ТЕСТОСТЕРОНА НА СОДЕРЖАНИЕ PGE₂ И ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ТРАНСКРИПЦИОННОГО ФАКТОРА NF- κ B В ТКАНИ СЕМЕННИКОВ КРЫС ПРИ ДИЕТЕ, ОБОГАЩЕННОЙ ФРУКТОЗОЙ..... 469

Михайлова И.В., Чайникова И.Н., Иванова Е.В., Синеговец А.А.

ЭФФЕКТ СОВМЕСТНОГО ВЛИЯНИЯ МЕТОТРЕКСАТА С ФИТОЭКСТРАКТАМИ КЛЕВЕРА И ЦИКОРИЯ НА ПРОДУКЦИЮ ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ *IN VITRO*..... 475

Титова С.А., Гетте И.Ф., Тонкушина М.О., Остроушко А.А.

ИММУНОМОРФОМЕТРИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ КРЫС ПРИ ВВЕДЕНИИ ПОЛИОКСОМЕТАЛЛАТОВ..... 481

Садек Али, Печенкина М.А., Храмцова Ю.С.

ДЛИТЕЛЬНАЯ АКТИВАЦИЯ ТУЧНЫХ КЛЕТОК КАК ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МОДЕЛЬ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ИХ РОЛИ В РЕГУЛЯЦИИ СПЕРМАТОГЕНЕЗА.....	487

Зудова А.И., Зильбер К.Ю., Мишури Я.В., Апанович С.В., Соломатина Л.В.

ИММУННЫЕ КЛЕТКИ ПРИ ОСТРОМ ОТРАВЛЕНИИ АЦЕТАМИНОФЕНОМ В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МОДЕЛИ.....	495

Колосова Е.Д., Лисица Д.А., Демидов О.Н., Богданова Д.А.

СВЕРХЭКСПРЕССИЯ <i>PRM1D</i> ПРИВОДИТ К ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНОМУ ЦИТОКИНОВОМУ ПРОФИЛЮ В ОТВЕТ НА АКТИВАЦИЮ NF- κ B В КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ КОЛОРЕКТАЛЬНОГО РАКА ЧЕЛОВЕКА	501

Егоров А.Н., Пашкина Е.А., Гольдерова А.С.

ВЛИЯНИЕ <i>PHLOJODICARPUS SIBIRICUS</i> НА СУБПОПУЛЯЦИОННЫЙ СОСТАВ КЛЕТОК КРОВИ И ТИМУСА МЫШЕЙ С МОДЕЛИРОВАННОЙ ОПУХОЛЬЮ	509

Жаркова М.С., Рудель А.Е., Дятлова А.С.

АКТИВНОСТЬ НОВЫХ ГИБРИДНЫХ СИНТЕТИЧЕСКИХ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ ПЕПТИДОВ CaBuCr И CaLTx <i>IN VIVO</i> В МОДЕЛИ АСЦИТНОЙ КАРЦИНОМЫ ЭРЛИХА МЫШИ	515

Долматова Л.С.

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ИММУНОМОДУЛИРУЮЩЕГО ВЛИЯНИЯ ЭКСТРАКТА ИЗ ГОЛОТУРИЙ И ИНДУКТОРОВ ПОЛЯРИЗАЦИИ МАКРОФАГОВ НА МОДЕЛИ ФАГОЦИТОВ <i>EUPENTASTA FRAUDATRIX</i> ПРИ РАНЕНИИ.....	521

Гордова В.С., Григорьева Е.А., Сергеева В.Е., Смородченко А.Т.

ЭФФЕКТ ТРЕХМЕСЯЧНОГО ПОСТУПЛЕНИЯ КРЕМНИЯ С ПИТЬЕВОЙ ВОДОЙ НА МОРФОЛОГИЮ АВИДИН-ПОЗИТИВНЫХ ТУЧНЫХ КЛЕТОК СЕЛЕЗЕНКИ МЫШЕЙ.....	529

Тиманова В.П., Бочкова М.С., Усанова Д.И., Долгих М.Д., Лазарев С.С., Раев М.Б., Заморина С.А.

ОЦЕНКА ЦИТОТОКСИЧНОСТИ ФУЛЛЕРЕНОЛА C ₆₀ (OH) ₂₂₋₂₄ В ОТНОШЕНИИ НК-КЛЕТОК ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА <i>IN VITRO</i>	533

Кузьмичева Н.А., Смолягин А.И., Филиппова Ю.В.

АНАЛИЗ ВЛИЯНИЯ ПРЕПАРАТА КК1 НА ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ И БИОХИМИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ У КРЫСЯТ, РОЖДЕННЫХ ОТ ПАССИВНО КУРИВШИХ КРЫС WISTAR	541

Арташян О.С., Ярема О.П.

ТУЧНЫЕ КЛЕТКИ ЛЕГКИХ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ВОЗДЕЙСТВИИ ГЛИЦЕРИН-ПРОПИЛЕНГЛИКОЛЕВОЙ КУРИТЕЛЬНОЙ СМЕСИ	547

Бобров М.Ю., Никитин В.С., Бурак М.Ю., Афонин М.Б.

ОЦЕНКА ИЗМЕНЕНИЙ ПРОФИЛЕЙ МЕТАБОЛИТОВ В КЛЕТКАХ МИКРОГЛИИ SIM-A9 ПОД ДЕЙСТВИЕМ ГИПОКСИИ И ЛИПОПОЛИСАХАРИДА.....	553

Алешина Г.М., Филатенкова Т.А., Шустов М.В.

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ TOLL-ПОДОБНЫХ РЕЦЕПТОРОВ В СЕЛЕЗЕНКЕ И ГИПОТАЛАМУСЕ КРЫС В УСЛОВИЯХ СТРЕССИРУЮЩЕГО ВОЗДЕЙСТВИЯ И ВВЕДЕНИЯ ДЕФЕНСИНА КРЫСЫ RatNP-3	561

Волосникова Е.А., Волкова Н.В., Гайворонский С.И., Симакова О.В., Есина Т.И., Пар А.А., Щербаков Д.Н.

КОНЬЮГАТЫ БЕЛКА А С АНТИГЕНОМ СПОСОБНЫ УСИЛИВАТЬ ВЫРАБОТКУ СПЕЦИФИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ ПРИ ИНТРАНАЗАЛЬНОМ ВВЕДЕНИИ.....	567

Пономарева В.Н., Власова В.В.

ОЦЕНКА ВОЗМОЖНОСТИ ОДНОВРЕМЕННОГО ИССЛЕДОВАНИЯ ГЛИКОЛИЗА И ОКИСЛИТЕЛЬНОГО ФОСФОРИЛИРОВАНИЯ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ТЕСТ-НАБОРОВ SEANORSE XF	573

Рубинштейн А.А.

ФЕНОТИПИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ДВАЖДЫ ПОЗИТИВНЫХ Т-КЛЕТОК В ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ УСЛОВНО ЗДОРОВЫХ ДОНОРОВ.....	579

Лапштанова А.В., Сычев И.В., Адамчик А.И.

СИСТЕМА CSF-1/CSF1R КАК ПРЕДИКТОР ЖИВОРОЖДЕНИЯ ПОСЛЕ ИНДУЦИРОВАННОЙ БЕРЕМЕННОСТИ	585

Горбунова О.Л., Ширшев С.В.

ВЛИЯНИЕ КИСПЕПТИНА НА ФАГОЦИТАРНУЮ АКТИВНОСТЬ МОНОЦИТОВ И НЕЙТРОФИЛОВ, АПОПТОЗ МОНОНУКЛЕАРНЫХ КЛЕТОК ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ В КОНТЕКСТЕ ФИЗИОЛОГИЧЕСКОЙ БЕРЕМЕННОСТИ	591

Коняшин М.В., Курбатова О.В., Петричук С.В., Мовсисян Г.Б., Фрейдлин Е.В., Купцова Д.Г., Радыгина Т.В., Семикина Е.Л.,

Потапов А.С., Фисенко А.П. АКТИВНОСТЬ ЯДЕРНОГО ФАКТОРА ТРАНСКРИПЦИИ NF- κ B В ПОПУЛЯЦИЯХ ЛИМФОЦИТОВ У ДЕТЕЙ С БОЛЕЗНЬЮ ГОШЕ	597

Гаева А.И., Чистякова Г.Н., Шакирова К.П., Кадочникова П.А.

ИММУННЫЕ МЕХАНИЗМЫ РАЗВИТИЯ ДЫХАТЕЛЬНЫХ НАРУШЕНИЙ У НЕДОНОШЕННЫХ ДЕТЕЙ.....	605

Зайкова Е.К., Каплина А.В., Петрова Н.А., Первунина Т.М., Костарева А.А., Калинина О.В.

ОЦЕНКА ДИАГНОСТИЧЕСКОЙ ЗНАЧИМОСТИ ЦИТОКИНОВ И МИКРОРНК У ДОНОШЕННЫХ НОВОРОЖДЕННЫХ С ВРОЖДЕННЫМИ ПОРОКАМИ СЕРДЦА В КАЧЕСТВЕ БИОМАРКЕРОВ НЕКРОТИЗИРУЮЩЕГО ЭНТЕРОКОЛИТА.....	611

Левкович М.А., Андреева В.О., Крукиер И.И., Авруцкая В.В., Ермолова Н.В., Кравченко Л.В.

ИЗУЧЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ЦИТОКИНОВ И ХЕМОКИНОВ ПРИ ОЛИГОМЕНОРЕЕ У ДЕВОЧЕК-ПОДРОСТКОВ С ОЖИРЕНИЕМ	619

Ленгина М.А., Коркмазов А.М., Казачков Е.Л., Медведева Ю.А.

РЕАЛИЗАЦИЯ АДАПТИВНОГО ИММУННОГО ОТВЕТА ПЛАЗМАТИЧЕСКИМИ КЛЕТКАМИ НА ЭТАПАХ ФОРМИРОВАНИЯ ПОЛИПОЗНОГО РИНОСИНУСИТА	625

Давыдова Н.В., Зиновьева Н.В., Сударикова Е.В., Севостьянова Ю.Н., Петрова Ю.В., Борисова Т.А., Галеева Е.В., Гильдеева Г.Н., Козлов И.Г.

ОСОБЕННОСТИ СУБПОПУЛЯЦИЙ ЛИМФОЦИТОВ У ПАЦИЕНТОВ С РАЗНЫМИ ФОРМАМИ ГИПЕР-IgE-СИНДРОМА	631

Климов А.В., Исаев П.Ю., Уразова О.И., Климов В.В., Денисов А.А., Загрешенко Д.С., Кухарев Я.В., Худякова М.И., Шкатова А.Н., Овчаренко Е.В., Селезнёва О.А., Рыжкова А.Ю.

ПИЩЕВАЯ СЕНСИБИЛИЗАЦИЯ ПРИ КРУГЛОГОДИЧНОМ АЛЛЕРГИЧЕСКОМ РИНИТЕ И БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЕ	639

Смольникова М.В., Горбачева Н.Н., Терещенко С.Ю.

ВЫСОКОЧУВСТВИТЕЛЬНЫЙ МУЛЬТИПЛЕКСНЫЙ АНАЛИЗ ИНТЕРЛЕЙКИНОВ В КОНДЕНСАТЕ ВЫДЫХАЕМОГО ВОЗДУХА У ДЕТЕЙ С БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ: ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ IL-13 И IL-17A	645

Пивоварова Л.П., Арискина О.Б., Осипова И.В., Демко А.Е., Рысева А.А., Громов М.И., Малькова В.М., Маркелова Е.В.

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ КАК РАННИЙ МАРКЕР ИНФЕКЦИОННОГО ВОСПАЛЕНИЯ ПРИ ОСТРОМ ПАНКРЕАТИТЕ	651

Савченко А.А., Здзитовецкий Д.Э., Анисимова Е.Н., Борисов Р.Н., Адипов М.М., Борисов А.Г.

ИЗМЕНЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ CD184 И CD195 НА РАЗЛИЧНЫХ СУБПОПУЛЯЦИЯХ МОНОЦИТОВ У БОЛЬНЫХ ОСТРЫМ ПАНКРЕАТИТОМ ПРИ КОМПЛЕКСНОМ ЛЕЧЕНИИ С ЦИТОФЛАВИНОМ	659

Пашина О.А., Пашкова Т.М., Гриценко В.А.

РЕГУЛЯЦИЯ СИНТЕТИЧЕСКИМ ПЕПТИДОМ ZP2 АНТИЦИТОКИНОВОЙ АКТИВНОСТИ МИКРООРГАНИЗМОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ПРИ ПОСЛЕОПЕРАЦИОННЫХ ОСЛОЖНЕНИЯХ	667

Осиков М.В., Конашов А.Г., Бойко М.С., Гусев А.В., Конашов В.А.

ПОКАЗАТЕЛИ ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА У БОЛЬНЫХ АБДОМИНАЛЬНЫМ СЕПСИСОМ С РАЗЛИЧНЫМ ИСХОДОМ	673

Аникеева Н.А., Жулева А.Ю., Белых Н.А., Абаленихина Ю.В., Паринская Е.С.

ОЦЕНКА УРОВНЕЙ IL-6 И IL-8 ПРИ ВНЕБОЛЬНИЧНОЙ ПНЕВМОНИИ У ДЕТЕЙ	681

Крицкий И.С., Зурочка А.В., Зурочка В.А., Сарапульцев А.П.

ВЛИЯНИЕ МЕЖДУНАРОДНЫХ ПОЕЗДОВ НА СЕРОРАСПРОСТРАНЕННОСТЬ SARS-CoV-2 СРЕДИ ЖИТЕЛЕЙ ГОРОДА ЧЕЛЯБИНСКА	687

Верховская М.Д., Марченко В.С.

ОСОБЕННОСТИ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ИММУННОГО ОТВЕТА У ПАЦИЕНТОВ С ПОСТКОВИДНЫМ СИНДРОМОМ И НАЛИЧИЕМ В АНАМНЕЗЕ ВИРУСА ГЕРПЕСА 6-ГО ТИПА (HHV-6)	695

Добрынина М.А.

ИММУНООПОСРЕДОВАННЫЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ У ПОСТКОВИДНЫХ ПАЦИЕНТОВ И ИХ СВЯЗЬ С НАРУШЕНИЕМ АКТИВНОСТИ СИСТЕМЫ КОМПЛЕМЕНТА	703

Мосунов А.А., Парфентьева Т.М.

ХРОНИЧЕСКАЯ ИНФЕКЦИЯ, ВЫЗВАННАЯ ВИРУСОМ ЭПШТЕЙНА-БАРР, КАК ФАКТОР ПРОГРЕССИРОВАНИЯ ПОСТКОВИДНОГО СИНДРОМА: РОЛЬ ДИСФУНКЦИИ СИСТЕМЫ КОМПЛЕМЕНТА КРОВИ И НЕЙТРОФИЛЬНОГО ЗВЕНА ИММУНИТЕТА	711

Зотова А.В., Нагиева Ф.Г., Баркова Е.П., Краскевич Д.А., Свистич О.А.

ЭКСПРЕССИЯ РЕЦЕПТОРОВ ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА ПОД ДЕЙСТВИЕМ ВАКЦИННЫХ ШТАММОВ ВИРУСА ВЕТРЯНОЙ ОСПЫ <i>IN VIVO</i>	719

Корнова Н.В., Гизингер О.А., Газиев А.Р., Зырянова К.С., Белошангин А.С.

ОСОБЕННОСТИ ГУМОРАЛЬНЫХ ФАКТОРОВ ИММУННОГО ОТВЕТА ПРИ ОСТРОМ ПОСТВИРУСНОМ РИНОСИНУСИТЕ У ЛИЦ, ПЕРЕНЕСШИХ КОРЬ	725

Жердева П.Е., Толпыгина А.П., Семикина Е.Л.

СРАВНЕНИЕ МЕТОДОВ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КЛЕТЧНОГО ИММУНИТЕТА К ВИРУСУ ЭПИДЕМИЧЕСКОГО ПАРОТИТА	731

Снигирев А.Я., Храмова Т.В., Меньшиков И.В.

АУТОАНТИТЕЛА К ЛИМФОЦИТАМ И ИХ СВЯЗЬ С КОЛИЧЕСТВОМ CD4 Т-ЛИМФОЦИТОВ ПРИ ВИЧ-ИНФЕКЦИИ	737

Лебедев В.М., Фролова О.М., Старикова Э.А., Маммедова Дж.Т., Кудрявцев И.В.

ССР6⁺СХСR3⁺CD8⁺Т-ЛИМФОЦИТЫ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ В ПАТОГЕНЕЗЕ РЕЦИДИВИРУЮЩЕ-РЕМИТТИРУЮЩЕГО РАССЕЯННОГО СКЛЕРОЗА	743

Журавлёва Ю.А., Турянская Ю.В., Соколова Л.А., Гусев Е.Ю.

ПОКАЗАТЕЛИ ХРОНИЧЕСКОГО СИСТЕМНОГО ВОСПАЛЕНИЯ У ПАЦИЕНТОВ С РАЗНОЙ СТЕПЕНЬЮ КОМПЕНСАЦИИ ИНСУЛИНОРЕЗИСТЕНТНОСТИ	751

Абрамова Т.Я., Боева О.С., Ангельская О.А., Борисевич В.И., Аббасова В.С., Королев М.А., Омельченко В.О., Курочкина Ю.Д., Рыбакова А.Д., Блинова Е.А.

ФЕНОТИПИЧЕСКАЯ И ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАННИХ ТИМИЧЕСКИХ МИГРАНТОВ В ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ В НОРМЕ И ПРИ АУТОИММУННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ	757

Александров В.А., Емельянов Н.И., Александров А.В., Зборовская И.А.

НОВЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ ДИНАМИЧЕСКОЙ ОЦЕНКИ СИСТЕМНОЙ ВОСПАЛИТЕЛЬНОЙ РЕАКЦИИ У ПАЦИЕНТОВ С РЕВМАТОИДНЫМ АРТРИТОМ	765

Орлова Е.А., Огарков О.Б., Колесникова Л.И.

ГУМОРАЛЬНЫЙ ИММУНИТЕТ К <i>S. KEFIRRESIDENTII</i> И <i>S. EPIDERMIDIS</i> – КОМПОНЕНТАМ ПАТОБИОТЫ ТУБЕРКУЛЕЗНЫХ ОЧАГОВ.....	773

Ахметьянов Р.Р., Сабирьянов А.Р.

МИОКИНОВЫЙ ПРОФИЛЬ КРОВИ ПРИ ТРАВМЕ ПЕРЕДНЕЙ КРЕСТООБРАЗНОЙ СВЯЗКИ КОЛЕННОГО СУСТАВА С НАЛИЧИЕМ ФЕНОМЕНА АРТРОГЕННОГО МЫШЕЧНОГО ТОРМОЖЕНИЯ	779

Пашнин С.Л., Альтман Д.Ш.

ПОКАЗАТЕЛИ НЕЙРОМЕДИАТОРНОГО ОБМЕНА И МАРКЕРЫ ВОСПАЛЕНИЯ ПРИ ПОСТТРАВМАТИЧЕСКОМ СТРЕССОВОМ РАССТРОЙСТВЕ У ВЕТЕРАНОВ СОВРЕМЕННЫХ ВОЙН	785

Александрова Н.В., Сивордова Л.Е., Курчина Е.Р., Ершов Я.Д., Красильников А.Н., Полякова Ю.В.

ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫЕ ЦИТОКИНЫ И РИСК РАЗВИТИЯ ОСТЕОПОРОТИЧЕСКИХ ПЕРЕЛОМОВ У ПАЦИЕНТОК С РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ В ПОСТМЕНОПАУЗЕ.....	791

Абакумова Т.В., Долгова Д.Р., Антонеева И.И., Мягдиева И.Р., Генинг Т.П., Генинг С.О., Бурханова Е.В.

ЦИРКУЛИРУЮЩИЕ ОПУХОЛЕВЫЕ СИГНАЛЬНЫЕ МОЛЕКУЛЫ <i>Wnt/β-CATENIN</i> И <i>WISP1</i> , <i>IL-8</i> КАК ПРОГНОСТИЧЕСКИЕ БИОМАРКЕРЫ ПРИ РАКЕ ЯИЧНИКОВ	797

Пашкина Е.А., Актанова А.А., Быкова М.В., Скачков И.П., Пронкина Н.В., Денисова В.В., Козлов В.А.

ОЦЕНКА СУБПОПУЛЯЦИОННОГО СОСТАВА <i>CD34+</i> ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ПРИ ГЕМОБЛАСТОЗАХ.....	805

Ревакина М.О., Кабина Н.А.

ЭКЗОСОМАЛЬНЫЕ ТЕТРАСПАНИНЫ: РОЛЬ <i>CD63</i> И <i>CD81</i> В ПАТОГЕНЕЗЕ ИНФАРКТА МИОКАРДА	811

Снимщикова И.А., Коньшина А.В.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ <i>Wnt-5a</i> В КАЧЕСТВЕ НОВОГО ДИАГНОСТИЧЕСКОГО БИОМАРКЕРА ПРИ ИНФАРКТЕ МИОКАРДА.....	817

Сафронова Э.А., Рябова Л.В., Сарапульцев Г.П.

СКРИНИНГОВАЯ ОЦЕНКА ИММУННОГО СТАТУСА ПАЦИЕНТОВ С ОСТРЫМ КОРОНАРНЫМ СИНДРОМОМ	823

Плехова Н.Г., Кабалык М.А., Цветов Н.В., Гороховская П.В., Иванюк М.М., Просекова Е.В., Бельды Е.С., Дондокова О.Э., Сабыныч В.А.

ПОКАЗАТЕЛИ КЛЕТОЧНОГО ИММУНИТЕТА ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПОЖИЛЫХ ПАЦИЕНТОВ ПРИ МАЛЬНУТРИЦИИ	829

Кузнецов А.А., Быстров А.М., Давыдова Е.В., Черешнева М.В., Гаврилова Т.В.

ЦИТОМЕТРИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА КЛЕТОЧНОГО КОМПАРТМЕНТА ИММУННОЙ СИСТЕМЫ У ПАЦИЕНТОВ ПОСЛЕ СКВОЗНОЙ КЕРАТОПЛАСТИКИ	837

Свитич О.А., Калинин С.А., Тарасенко С.В., Быстрицкая Е.П.

ОЦЕНКА ДИНАМИКИ УРОВНЯ ПРОДУКЦИИ <i>IL-1β</i> , <i>TNFα</i> И <i>IL-10</i> ПРИ ВЕСТИБУЛОПЛАСТИКЕ СКАЛЬПЕЛЕМ И ЛАЗЕРОМ В ОБЛАСТИ ДЕНТАЛЬНЫХ ИМПЛАНТАТОВ.....	847

Саркисян Н.Г., Катаева Н.Н., Демидов С.Д., Мкртчян И.Г., Меликян А.Г., Осипова И.М.

ВОСПАЛИТЕЛЬНЫЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ ЧЕЛЮСТНО-ЛИЦЕВОЙ ОБЛАСТИ И ПОЛОСТИ РТА НА ФОНЕ ИММУНОДЕФИЦИТОВ	855

Колупаев В.А., Сашенков С.Л., Котова Н.В.

КЛАСТЕРНЫЙ АНАЛИЗ ИММУНОГРАММЫ ОБУЧАЮЩИХСЯ С РАЗНЫМ УРОВНЕМ ДВИГАТЕЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ.....	861

Уразмамбетов Р.Т., Андреева И.И., Антонова Е.А.

ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ПСИХОЛОГИЧЕСКОЙ АДАПТАЦИИ В ПРОФЕССИОНАЛЬНОМ ОБРАЗОВАНИИ ВОЕННЫХ ВРАЧЕЙ	867

ЮБИЛЕЙ	872

АВТОРСКИЙ УКАЗАТЕЛЬ.....	875

ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ	877

CONTENTS

Short communications

Berdiugina O.V.

USAGE OF ARTIFICIAL INTELLIGENCE CAPABILITIES IN IMMUNOLOGY: FROM LITERATURE REVIEW TO STATISTICAL PROCESSING AND ANALYSIS OF OBTAINED DATA	355

Saidakova E.V.

NOVEL APPROACH TO CELL CYCLE ANALYSIS OF T LYMPHOCYTES USING FLOW CYTOMETRY	363

Glebezdina N.S.

MELATONIN TARGET PROTEINS: INTERACTIONS AND FUNCTIONS	369

Kuklina E.M., Danchenko I.Yu., Baidina T.V.

MT1/MT2 MELATONIN RECEPTORS IN PROINFLAMMATORY T HELPER CELL POPULATIONS	375

Erdynееva D.B., Nikiforov N.G., Verkhova S.S., Orekhov A.N., Kulagova T.A.

INFLUENCE OF CYTOKINES ON MACROPHAGE TOLERANCE TO LIPOPOLYSACCHARIDE	381

Nekrasova I.V., Loginova O.A., Orlova E.G.

ESTRIOL EFFECT ON PROLIFERATIVE ACTIVITY OF REGULATORY THYMOCYTE SUBPOPULATIONS	387

Nikolenko M.V., Kostolomova E.G., Sivkova D.S., Borisenok A.I., Baryshnikova N.V., Malishevskaya O.I., Vaseva E.M., Prikhodko Yu.S.

MONOCYTE CULTURE AS A MODEL FOR <i>IN VITRO</i> TESTING OF PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS	393

Zabokritskiy N.A.

IMMUNOPHARMACOLOGICAL ASPECTS OF EXPERIMENTAL EVALUATION OF THE NEW BIOCOMPOUND	399

Sukhikh A.A., Zhukova D.S., Karal-ogly D.D., Klots I.N., Zlobina A.P., Akulov A.P., Tereshchenko V.P., Rybtsov S.A.

FEATURES OF BLOOD AGING IN <i>MACACA FASCICULARIS</i>	403

Gein S.V., Polyudova T.V., Ibatullin M.V.

<i>IN VIVO</i> AND <i>IN VITRO</i> INFLUENCE OF BACTERIOCINS ON THE FUNCTIONS OF INNATE IMMUNE CELLS	409

Maslennikova I.L.

EFFECTS OF UROPATHOGENIC <i>E. COLI</i> BIOFILMS AND THEIR SUPERNATES ON MYELOPEROXYDASE AND CATHEPSIN G SECRETION BY HUMAN NEUTROPHILS AND BLOOD MONONUCLEARS	415

Popova L.P., Kuzmin M.D., Kartashova O.L.

ANTICYTOKINE ACTIVITY OF MICROORGANISMS ISOLATED IN CHRONIC BACTERIAL PROSTATITIS	421

Korolevskaya L.B., Shmagel K.V.

PRECULTIVATION OF CELLS SUBJECTED TO LONG-TERM CRYOPRESERVATION NEGATIVELY AFFECTS PROLIFERATIVE ACTIVITY OF T LYMPHOCYTES	425

Kolberg N.A., Mukhlynnina E.A., Kobelev Yu.G., Danilova I.G.

EFFECT OF EXTRACT FROM BURSA FABRICII ON IMMUNOLOGICAL PARAMETERS OF BLOOD IN C57Bl/6 MICE WITH CYCLOPHOSPHAMIDE-INDUCED IMMUNODEFICIENCY	431

Beduleva L.V., Fomina K.V., Menshikova D.I., Terentieva O.S., Yushkov D.P.

EXPERIMENTAL MODEL OF SJOGREN'S SYNDROME ACCOMPANIED BY T LYMPHOCYTOPENIA	437

Ivanov P.V., Sidorov A.Yu., Terentiev A.S., Cherepanov I.S.

REGULATORY RHEUMATOID FACTOR IN RAT MODEL OF SJOGREN'S SYNDROME	443

Kryazhevskikh A.V., Abisheva N.N.

RHEUMATOID REGULATORY FACTOR IN THE BLOOD OF RATS IMMUNIZED WITH AUTOLOGOUS LYMPHOCYTES, ACTIVATED <i>IN VITRO</i> BY HETEROLOGOUS LYMPHOCYTES	449

Sredneva L.A., Sultanova T.R.

EFFECT OF α -LIPOIC ACID AND APG ON BLOOD PARAMETERS	455

Sokolova K.V., Tukanov D.A.

RED CLOVER (<i>TRIFOLIUM PRATENSE</i>) ISOFLAVONES REDUCE OXIDATIVE STRESS IN THE SPLEEN AND LIVER OF RATS WITH TYPE 2 DIABETES	461

Ovchinina N.G., Urakova M.A., Bryndina I.G., Sekunov A.V., Protopopov V.A.

EFFECT OF TESTOSTERONE DRUG ON RAGE AND INFLAMMATORY TRANSCRIPTION FACTOR NF- κ B IN RAT TESTICULAR TISSUE AT THE FRUCTOSE-ENRICHED DIET	469

Mikhailova I.V., Chaynikova I.N., Ivanova E.V., Sinegovets A.A.

COMBINED EFFECT OF METHOTREXATE AND PHYTOEXTRACTS OF MEADOW CLOVER AND COMMON CHICORY ON THE <i>IN VITRO</i> PRODUCTION OF PRO-INFLAMMATORY CYTOKINES	475

Titova S.A., Gette I.F., Tonkushina M.O., Ostroushko A.A.

IMMUNOMORPHOMETRIC INDICES IN RATS AFTER ADMINISTRATION OF POLYOXOMETALATES	481

Sadek Ali, Pechenkina M.A., Khramtsova Yu.S.

LONG-TERM ACTIVATION OF MAST CELLS AS AN EXPERIMENTAL MODEL FOR STUDYING THEIR ROLE IN THE REGULATION OF SPERMATOGENESIS	487

Zudova A.I., Zilber K.Yu., Mishurin Ya.V., Apanovich S.V., Solomatina L.V.	
IMMUNE CELLS IN EXPERIMENTAL MODEL OF ACUTE POISONING WITH ACETAMINOPHEN	495
Kolosova E.D., Lisitsa D.A., Demidov O.N., Bogdanova D.A.	
PPM1D OVEREXPRESSION IS ASSOCIATED WITH PROINFLAMMATORY CYTOKINE PROFILE IN RESPONSE TO NF-κB ACTIVATION IN HUMAN COLORECTAL CANCER CELL LINE	501
Egorov A.N., Pashkina E.A., Golderova A.S.	
EFFECT OF <i>PHLOJODICARPUS SIBIRICUS</i> ON THE SUBPOPULATION PROFILE OF BLOOD CELLS AND THYMUS OF MICE WITH A SIMULATED TUMOR	509
Zharkova M.S., Rudel A.E., Diatlova A.S.	
IN VIVO ACTIVITY OF NOVEL HYBRID SYNTHETIC ANTITUMOR PEPTIDES CaBuCr AND CaLTx IN MURINE MODEL OF EHRlich ASCITES CARCINOMA	515
Dolmatova L.S.	
COMPARISON OF IMMUNOMODULATORY EFFECTS INDUCED BY HOLOTHURIAN EXTRACT AND MACROPHAGE POLARIZATION DRIVERS USING MODEL OF PHAGOCYTES OF INJURED <i>EUPENTACTA FRAUDATRIX</i>.....	521
Gordova V.S., Grigoryeva E.A., Sergeeva V.E., Smorodchenko A.T.	
EFFECTS OF THREE-MONTH INTAKE OF SILICON FROM DRINKING WATER ON THE MORPHOLOGY OF AVIDIN-POSITIVE MAST CELLS IN MURINE SPLEEN	529
Timganova V.P., Bochkova M.S., Usanina D.I., Dolgikh M.D., Lazarev S.S., Rayev M.B., Zamorina S.A.	
EVALUATION OF CYTOTOXICITY OF FULLERENOL C₆₀(OH)₂₂₋₂₄ TOWARDS HUMAN PERIPHERAL BLOOD NK CELLS <i>IN VITRO</i>	533
Kuzmicheva N.A., Smolyagin A.I., Filippova Yu.V.	
ANALYSIS OF KK1 COMPOUND EFFECTS ON IMMUNOLOGICAL AND BIOCHEMICAL PARAMETERS IN PRENATALLY TOBACCO-EXPOSED RAT WISTAR OFFSPRING	541
Artashyan O.S., Yarema O.P.	
MAST CELLS OF THE LUNGS DURING EXPERIMENTAL EXPOSURE TO GLYCERIN-PROPYLENE GLYCOL SMOKING MIXTURE	547
Bobrov M.Yu., Nikitin V.S., Burak M.Yu., Afonin M.B.	
EVALUATION OF CHANGED METABOLITE PROFILES IN SIM-A9 MICROGLIAL CELLS UNDER THE INFLUENCE OF HYPOXIA AND LIPOPOLYSACCHARIDE	553
Aleshina G.M., Filatenkova T.A., Shustov M.V.	
EXPRESSION OF TOLL-LIKE RECEPTOR GENES IN RAT SPLEEN AND HYPOTHALAMUS UNDER CONDITIONS OF STRESS EXPOSURE AND ADMINISTRATION OF RAT DEFENSIN RatNP-3	561
Volosnikova E.A., Volkova N.V., Gayvoronskiy S.I., Simakova O.V., Esina T.I., Rar A.A., Shcherbakov D.N.	
PROTEIN A-ANTIGEN CONJUGATES ENHANCE PRODUCTION OF SPECIFIC ANTIBODIES FOLLOWING INTRANASAL ADMINISTRATION.....	567
Ponomareva V.N., Vlasova V.V.	
ASSESSING FEASIBILITY OF SIMULTANEOUS EVALUATION OF GLYCOLYSIS AND OXIDATIVE PHOSPHORYLATION USING SEAHORSE XF TEST KITS	573
Rubinstein A.A.	
PHENOTYPIC CHARACTERISTICS OF DOUBLE-POSITIVE T CELLS IN PERIPHERAL BLOOD OF HEALTHY ADULTS	579
Lapshtaeva A.V., Sychev I.V., Adamchik A.I.	
CSF-1/CSF1R SYSTEM AS PREDICTOR OF LIVE BIRTH AFTER INDUCED PREGNANCY	585
Gorbunova O.L., Shirshev S.V.	
EFFECT OF KISSPEPTIN ON MONONUCLEAR CELL APOPTOSIS, PHAGOCYTIC ACTIVITY OF MONOCYTES AND NEUTROPHILS IN PREGNANCY	591
Konyashin M.V., Kurbatova O.V., Petrichuk S.V., Movsisyan G.B., Freidlin E.V., Kuptsova D.G., Radygina T.V., Semikina E.L., Potapov A.S., Fisenko A.P.	
ACTIVITY OF THE NUCLEAR TRANSCRIPTION FACTOR NF-κB IN LYMPHOCYTE POPULATIONS IN CHILDREN WITH GAUCHER DISEASE	597
Gaeva A.I., Chistyakova G.N., Shakirova K.P., Kadochnikova P.A.	
IMMUNE MECHANISMS OF RESPIRATORY DISORDERS DEVELOPING IN PRETERM INFANTS	605
Zaikova E.K., Kaplina A.V., Petrova N.A., Pervunina T.M., Kostareva A.A., Kalinina O.V.	
DIAGNOSTIC VALUE OF CYTOKINES AND microRNAs AS BIOMARKERS OF NECROTIZING ENTEROCOLITIS IN TERM NEWBORNS WITH CONGENITAL HEART DEFECTS	611
Levkovich M.A., Andreeva V.O., Kruker I.I., Avrutskaya V.V., Ermolova N.V., Kravchenko L.V.	
STUDY OF CYTOKINE AND CHEMOKINE LEVELS IN OLIGOMENORRHEA IN OBESE ADOLESCENT GIRLS.....	619
Lengina M.A., Korkmazov A.M., Kazachkov E.L., Medvedeva Yu.A.	
FEATURES OF ADAPTIVE PLASMA CELL IMMUNE RESPONSE AT DIFFERENT STAGES OF POLYPOUS RHINOSINUSITIS	625
Davydova N.V., Zinovieva N.V., Sudarikova E.V., Sevostyanova Yu.N., Petrova Yu.V., Borisova T.A., Galeeva E.V., Gildeeva G.N., Kozlov I.G.	
FEATURES OF LYMPHOCYTE SUBPOPULATIONS IN PATIENTS WITH DIFFERENT FORMS OF HYPER-IgE SYNDROME	631
Klimov A.V., Isaev P.Yu., Urazova O.I., Klimov V.V., Denisov A.A., Zagreshenko D.S., Kukharev Ya.V., Khudyakova M.I., Shkatova A.N., Ovcharenko E.V., Selezneva O.A., Ryzhkova A.Yu.	
FOOD SENSITIZATION IN PERMANENT ALLERGIC RHINITIS AND BRONCHIAL ASTHMA.....	639

Smolnikova M.V., Gorbacheva N.N., Tereshchenko S.Yu.

HIGHLY SENSITIVE MULTIPLEX ASSAY OF INTERLEUKINS IN EXHALED BREATH CONDENSATE FROM CHILDREN WITH BRONCHIAL ASTHMA: DIAGNOSTIC SIGNIFICANCE OF IL-13 AND IL-17A	645

Pivovarov L.P., Ariskina O.B., Osipova I.V., Demko A.E., Ryseva A.A., Gromov M.I., Malkova V.M., Markelova E.V.

FUNCTIONAL ACTIVITY OF NEUTROPHILIC GRANULOCYTES AS AN EARLY MARKER OF INFECTIOUS INFLAMMATION IN ACUTE PANCREATITIS	651

Savchenko A.A., Zdzitovetskiy D.E., Anisimova E.N., Borisov R.N., Adilov M.M., Borisov A.G.

CHANGES IN CD184 AND CD195 EXPRESSION ON VARIOUS MONOCYTE SUBPOPULATIONS IN PATIENTS WITH ACUTE PANCREATITIS DURING COMPLEX TREATMENT WITH CYTOFLAVIN	659

Pashinina O.A., Pashkova T.M., Gritsenko V.A.

REGULATION OF ANTI-CYTOKINE ACTIVITY OF BACTERIAL ISOLATES IN POST-SURGICAL COMPLICATIONS BY SYNTHETIC PEPTIDE ZP2.....	667

Osikov M.V., Konashov A.G., Boyko M.S., Gusev A.V., Konashov V.A.

INDEXES OF INNATE IMMUNITY IN PATIENTS WITH ABDOMINAL SEPSIS WITH DIFFERENT OUTCOMES.....	673

Anikeeva N.A., Zhuleva A.Yu., Belykh N.A., Abalenikhina Yu.V., Parinskaya E.S.

ASSESSMENT OF IL-6 AND IL-8 LEVELS IN COMMUNITY-ACQUIRED PNEUMONIA IN CHILDREN	681

Kritsky I.S., Zurochka A.V., Zurochka V.A., Sarapultsev A.P.

IMPACT OF INTERNATIONAL TRAVELS ON SEROPREVALENCE OF SARS-CoV-2 AMONG RESIDENTS OF CHELYABINSK CITY	687

Verkhovskaya M.D., Marchenko V.S.

FEATURES OF IMMUNE RESPONSE IN PATIENTS WITH POST-COVID SYNDROME AND A HISTORY OF TYPE 6 HERPES	695

Dobrynina M.A.

IMMUNE-MEDIATED DISORDERS IN POST-COVID PATIENTS AND THEIR RELATIONSHIP WITH IMPAIRED COMPLEMENT SYSTEM ACTIVITY	703

Mosunov A.A., Parfentyeva T.M.

CHRONIC EPSTEIN-BARR VIRUS INFECTION AS A MODULATOR OF POST-COVID SYNDROME SEVERITY: IMPLICATIONS OF COMPLEMENT CASCADE DYSREGULATION AND NEUTROPHIL IMMUNE DYSFUNCTION	711

Zotova A.V., Nagieva F.G., Barkova E.P., Kraskevich D.A., Svitich O.A.

EXPRESSION OF INNATE IMMUNITY RECEPTORS UNDER THE <i>IN VIVO</i> INFLUENCE OF VACCINE VARICELLA ZOSTER VIRUS STRAINS	719

Kornova N.V., Gizinger O.A., Gaziev A.R., Zyrianova K.S., Beloshangin A.S.

FEATURES OF HUMORAL IMMUNE RESPONSE IN ACUTE POST-VIRAL RHINOSINUSITIS IN FORMER MEASLES PATIENTS	725

Zherdeva P.E., Toptygina A.P., Semikina E.L.

COMPARISON OF METHODS FOR EVALUATION OF CELLULAR IMMUNITY TO MUMPS VIRUS	731

Snigirev A.Ya., Khranova T.V., Menshikov I.V.

AUTOANTIBODIES TO LYMPHOCYTES AND THEIR RELATIONSHIP TO THE NUMBER OF CD4 T LYMPHOCYTES IN HIV INFECTION	737

Lebedev V.M., Frolova O.M., Starikova E.A., Mammedova J.T., Kudryavtsev I.V.

PERIPHERAL BLOOD CCR6⁺CXCR3⁺CD8⁺T CELLS IN PATHOGENESIS OF RELAPSING-REMITTING MULTIPLE SCLEROSIS.....	743

Zhuravleva Yu.A., Turyanskaya Yu.V., Sokolova L.A., Gusev E.Yu.

PARAMETERS OF CHRONIC SYSTEMIC INFLAMMATION IN PATIENTS WITH DIFFERENT COMPENSATION DEGREE OF INSULIN RESISTANCE.....	751

Abramova T.Ya., Boeva O.S., Angelskaya O.A., Borisevich V.I., Abbasova V.S., Korolev M.A., Omelchenko V.O., Kurochkin Yu.D., Rybakova A.D., Blinova E.A.

PHENOTYPIC AND FUNCTIONAL CHARACTERISTICS OF EARLY THYMIC CELLS MIGRATING TO PERIPHERAL BLOOD UNDER NORMAL CONDITIONS AND IN AUTOIMMUNE DISORDERS	757

Aleksandrov V.A., Emelyanov N.I., Aleksandrov A.V., Zborovskaya I.A.

NEW OPPORTUNITIES FOR DYNAMIC EVALUATION OF SYSTEMIC INFLAMMATORY RESPONSE IN PATIENTS WITH RHEUMATOID ARTHRITIS	765

Orlova E.A., Ogarkov O.B., Kolesnikova L.I.

HUMORAL IMMUNE RESPONSE TO <i>C. KEFIRRESIDENTII</i> AND <i>S. EPIDERMIDIS</i> AS PATHOBIOTIC COMPONENTS OF TUBERCULOSIS FOCI	773

Akhmetyanov R.R., Sabiryanov A.R.

BLOOD MYOKINE PROFILE IN ANTERIOR CRUCIATE LIGAMENT INJURY OF THE KNEE JOINT WITH ARTHROGENIC MUSCLE INHIBITION.....	779

Pashnin S.L., Altman D.Sh.

NEUROMEDIATOR METABOLISM AND INFLAMMATION MARKERS IN POSTTRAUMATIC STRESS DISORDER IN THE MODERN WAR VETERANS	785

Aleksandrova N.V., Sivordova L.E., Kurchina E.R., Ershov Ya.D., Krasilnikov A.N., Polyakova Yu.V.

PROINFLAMMATORY CYTOKINES AND THE RISK OF OSTEOPOROTIC FRACTURES IN POSTMENOPAUSAL BREAST CANCER PATIENTS.....	791

Abakumova T.V., Dolgova D.R., Antoneeva I.I., Myagdieva I.R., Gening T.P., Gening S.O., Burkhanova E.V. CIRCULATING TUMOR SIGNALING MOLECULES Wnt/β-CATENIN AND WISP1, IL-8 AS PROGNOSTIC BIOMARKERS IN OVARIAN CANCER	797
Pashkina E.A., Aktanova A.A., Bykova M.V., Skachkov I.P., Pronkina N.V., Denisova V.V., Kozlov V.A. SUBPOPULATION PROFILE OF CD34⁺ PLURIPOTENT HEMATOPOIETIC STEM CELLS IN BLOOD MALIGNANCIES	805
Reviakina M.O., Kabina N.A. EXOSOMAL TETRASPANINS: THE ROLE OF CD63 AND CD81 IN PATHOGENESIS OF MYOCARDIAL INFARCTION	811
Snimshchikova I.A., Konshina A.V. WNT-5a AS A POTENTIAL NOVEL BIOMARKER IN MYOCARDIAL INFARCTION	817
Safronova E.A., Ryabova L.V., Sarapultsev G.P. SCREENING OF IMMUNE STATUS IN PATIENTS WITH ACUTE CORONARY SYNDROME	823
Plekhnova N.G., Kabalyk M.A., Tsvetov N.V., Gorokhovskaya P.V., Ivanyuk M.M., Prosekova E.V., Beldy E.S., Dondokova O.E., Sabynych V.A. INDICES OF THE PERIPHERAL BLOOD CELLULAR IMMUNITY ELDERLY IN THE PATIENTS WITH MALNUTRITION	829
Kuznetsov A.A., Bystrov A.M., Davydova E.V., Chereshneva M.V., Gavrilova T.V. CYTOMETRIC EVALUATION OF IMMUNE CELL COMPARTMENTS IN PATIENTS AFTER PENETRATING KERATOPLASTY	837
Svitich O.A., Kalinin S.A., Tarasenko S.V., Bystritskaya E.P. DYNAMICS OF IL-1β, TNFα AND IL-10 PRODUCTION DURING VESTIBULOPLASTY WITH LANCET SURGERY OR LASER TECHNIQUE IN THE AREA OF DENTAL IMPLANTS	847
Sarkisyan N.G., Kataeva N.N., Demidov S.D., Mkrtchan I.G., Melikyan A.H., Osipova I.M. INFLAMMATORY DISEASES OF THE MAXILLOFACIAL REGION AND ORAL CAVITY IN THE PATIENTS WITH IMMUNE DEFICIENCY	855
Kolupaev V.A., Sashenkov S.L., Kotova N.V. CLUSTER ANALYSIS OF IMMUNOGRAMS OF TRAINEES WITH DIFFERENT LEVELS OF MOTOR ACTIVITY	861
Urazmambetov T.A., Andreeva I.I., Antonova E.A. IMMUNOLOGICAL FEATURES OF PSYCHOLOGICAL ADAPTATION IN PROFESSIONAL EDUCATION OF MILITARY DOCTORS	867
ANNIVERSARY	872
AUTHOR INDEX	875
SUBJECT INDEX	877

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ВОЗМОЖНОСТЕЙ ИСКУССТВЕННОГО ИНТЕЛЛЕКТА В ИММУНОЛОГИИ: ОТ ОБЗОРА ЛИТЕРАТУРЫ ДО СТАТИСТИЧЕСКОЙ ОБРАБОТКИ И АНАЛИЗА ПОЛУЧЕННЫХ ДАННЫХ

Бердюгина О.В.

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

Резюме. Традиционное изучение литературы, использование стандартных методов анализа данных в иммунологии занимает значительное время, не всегда позволяя справиться с масштабом и сложностью проблемы. Искусственный интеллект может помочь в решении этого вопроса, автоматизируя процессы поиска и экспертизы актуальных сведений, позволяя ученым извлекать важные факты из больших объемов информации. Целью исследования стало определение потенциала искусственного интеллекта в иммунологических исследованиях с акцентом на автоматизацию сбора литературных данных и анализ цифровых сведений. Теоретическая часть работы основана на изучении материалов баз PubMed, Scopus, Google Scholar, ResearchGate за 2000–2025 годы, тип — оригинальная статья или обзор литературы. Основа стратегии поиска — использование ключевых слов, процесс отбора публикаций заключался в скрининге заголовков, аннотаций и полных текстов исследований. Практическая часть работы выполнена как сравнительный анализ результатов, ранее изученных данных, с выводами, полученными при использовании технологий искусственного интеллекта, на примерах моделей GPT v.4.0. Установлено, что технологи искусственного интеллекта могут быть полезны в работе над созданием обзора литературы по иммунологии, включая формирование резюме, синтез графиков и схем, визуализирующих новые сигнальные пути, взаимосвязи между клетками, факторы развития заболеваний. Помимо работы с текстами, искусственный интеллект может быть применен для статистической обработки и анализа цифровых данных, например, выявления закономерностей, решения вопросов прогнозирования, построения моделей, рассмотрения других более сложных задач. При сравнении ранее изученных данных с результатами использования GPT v.4.0 установлено, что у разных чат-ботов могут встречаться следующие недостатки: зависимость ответа от стиля формулирования запроса, синтез информации в очень обобщенном виде, создание небольших объемов

Адрес для переписки:

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

Address for correspondence:

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

Образец цитирования:

О.В. Бердюгина «Использование возможностей
искусственного интеллекта в иммунологии: от обзора
литературы до статистической обработки и анализа
полученных данных» // Российский иммунологический
журнал, 2025. Т. 28, № 3. С. 355–362.
doi: 10.46235/1028-7221-17100-UOA

© Бердюгина О.В., 2025

Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

O.V. Berdiugina “Usage of artificial intelligence capabilities in
immunology: From literature review to statistical processing and
analysis of obtained data”, Russian Journal of Immunology/
Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2025, Vol. 28, no. 3,
pp. 355–362.
doi: 10.46235/1028-7221-17100-UOA

© Berdiugina O.V., 2025

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

DOI: 10.46235/1028-7221-17100-UOA

текста (до 1000 слов), риск плагиата, сложности с синтезом рисунков, схем, таблиц, представление исчерпывающей информации преимущественно на английском языке, самостоятельное синтезирование несуществующих ссылок на литературные источники. Выводы: 1. Искусственный интеллект может преобразовать иммунологические исследования, позволяя проводить более эффективный обзор литературы и более глубокий анализ данных, однако на начальных этапах требуется экспертный надзор. 2. По мере развития технологий искусственного интеллекта они станут неотъемлемой частью инструментария иммунолога.

Ключевые слова: искусственный интеллект, машинное обучение, GPT, чат-бот, анализ данных, иммунология

USAGE OF ARTIFICIAL INTELLIGENCE CAPABILITIES IN IMMUNOLOGY: FROM LITERATURE REVIEW TO STATISTICAL PROCESSING AND ANALYSIS OF OBTAINED DATA

Berdiugina O.V.

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

Abstract. Traditional literature review and the standard methods of data analysis in immunology is time-consuming and does not allow rapid solution of large-scale and complex research problems. Artificial intelligence can assist in addressing this issue by automating the processes of search and evaluation of relevant information. The aim of this study was to determine the potential of artificial intelligence in immunological research, based on the automated collection of literature data and analysis of digital information. The theoretical aspect of the study was based on the analysis of materials from PubMed, Scopus, ResearchGate databases covering the years 2000-2025. The practical approach was conducted via comparative analysis of previously published data and conclusions obtained by means of artificial intelligence technologies, e.g., by GPT v.4.0 models. It was found that artificial intelligence technologies may be useful in conducting literature reviews in immunology, including compilation of findings, generation of graphical presentations, as well as visualization of new signaling pathways, cellular interactions, and disease-related factors. In addition to the text analysis, artificial intelligence may be applied to statistical processing and digital data analysis, such as detection of regularities, solution of forecasting issues, design of models. A comparison of previously studied data with the results obtained using GPT v.4.0 revealed several limitations of different chatbot models, including the dependence of responses on the style of query formulation, excessively generalized information synthesis, limited text output (up to 1,000 words), plagiarism risks, difficulties in generating figures, diagrams, and tables, presentation of comprehensive information predominantly in English, and spontaneous creation of non-existent references to the literature sources. **Conclusions:** 1. Artificial intelligence may sufficiently change immunological research, allowing for a more effective literature reviewing and deeper data analysis, however, requiring expert supervision at the initial stages. 2. Upon development of artificial intelligence technologies, they will become an integral part of the immunologist's toolkit.

Keywords: artificial intelligence, machine learning, GPT, chatbot, data analysis, immunology

Работа выполнена по теме государственного задания НИР ФГБУН «ИИФ» УрО РАН № гос. регистрации 122020900136-4

Введение

Развитие иммунологии как науки сопровождается экспоненциальным ростом числа новых исследований, ежегодной публикацией тысяч статей. Подобная тенденция, с одной стороны, дает возможность значимо расширять горизонты

знаний, с другой стороны, создает существенные проблемы для ученых, старающихся быть в курсе последних новостей и успеть проанализировать информацию из разных источников. Особенностью увеличения объема новых сведений становится ситуация, когда специалисты, занимающиеся исследованием проблем, не связанных между собой разделов иммунологии, сталкиваются с коммуникативными барьерами или проблемами в знаниях друг друга.

Традиционное изучение литературы, использование стандартных методов анализа занимает значительное время, не всегда позволяя справиться с масштабом и сложностью проблемы. Искусственный интеллект (ИИ) может помочь в решении этого вопроса, автоматизируя процессы поиска и экспертизы актуальных сведений, позволяя ученым извлекать важные факты из больших объемов данных. Например, имеется опыт применения методов искусственного интеллекта в биомедицине с использованием программ обработки естественного языка (natural language processing, NLP), машинного (machine learning, ML) и глубокого обучения (deep learning, DL) [8].

Целью данной работы стало определение потенциала искусственного интеллекта в иммунологических исследованиях с акцентом на автоматизацию сбора литературных данных и анализ цифровых сведений.

Материалы и методы

Теоретическая часть работы основана на результатах изучения материалов из открытых источников — баз PubMed, Scopus, Google Scholar, ResearchGate — за 2000–2025 годы, тип — оригинальная статья или обзор литературы; из рассмотрения исключались редакционные статьи в связи с отсутствием ссылок на научно обоснованные исследования. Основа стратегии поиска — использование ключевых слов: artificial intelligence, machine learning, NLP, data analysis, GPT (generative pre-trained transformer), immunology. Процесс отбора публикаций заключался в скрининге заголовков и аннотаций, а также полных текстов исследований, ограничением была доступность источников информации для широкого пользователя: не включены «закрытые» публикации.

Практическая часть работы выполнена как сравнительный анализ результатов ранее изученных данных [1] с выводами, полученными при использовании технологий искусственного интеллекта, на примерах моделей GPT v.4.0, в частности ChatGPT (<https://chatgpt.com/>), API (<https://platform.openai.com/>), Duck.ai (<https://duckduckgo.com/?q=DuckDuckGo+AI+Chat&ia=chat&duckai=1>) от OpenAI, Microsoft 365 Copilot (<https://www.microsoft.com/en-us/microsoft-365/copilot>), Bing Chat (<https://copilot.microsoft.com/chats/7M5nYXy3DNQC7vZVBVCwE>) от Microsoft, DeepSeek-R1 (<https://www.deepseek.com/>) от Hangzhou DeepSeek Artificial Intelligence, Qwen (<https://chat.qwenlm.ai/>) от Alibaba Cloud, Med-PaLM (<https://sites.research.google/med-palm/>) от Google Research.

Для визуализации полученных данных использован шаблон из интернет-источника <https://presentation-creation.ru/>.

Результаты и обсуждение

Установлено, что процесс поиска и анализа научной информации в области иммунологии может быть автоматизирован путем привлечения искусственного интеллекта. Помимо этого, возможно решение еще одной важной задачи. Известно, что литературные обзоры, выявляющие пробелы в знаниях и определяющие актуальные направления поиска, нередко содержат авторскую оценку полученных сведений [6], при этом субъективность восприятия может привести к искажению фактов, недостоверным выводам, затрудняющим сравнение полученных данных. Искусственный интеллект позволяет избежать этого недостатка: он обезличивает взгляд на проблему.

Первым направлением работы с научными текстами с привлечением искусственного интеллекта может быть собственно создание обзора литературы на какую-либо тему, например «Оценка взаимосвязи между изменением функции иммунных клеток, концентрации цитокинов с клиническими формами болезни». В основе такой работы — анализ рефератов и полнотекстовых статей из доступных источников. В частности, исследование Mohammad Piri S. и соавт. (2024) продемонстрировало возможности искусственного интеллекта в создании литературного обзора, раскрывающего патогенетическую роль Tfh в развитии аутоиммунных заболеваний.

Вторым подходом к использованию новых технологий в иммунологии может быть использование искусственного интеллекта для обобщения литературных данных, а именно: создания кратких обзоров научных статей, написания авторефератов, резюме. Для пользователя такая возможность позволяет быстро ознакомиться с основными положениями и выводами публикации. Примером может быть обобщение сведений, касающихся подходов к изучению микробиома с целью оценки его взаимодействия с макроорганизмом на основе данных экспрессии генов, изменения уровня метаболитов при разных нозологических формах [4].

Третьим подходом в использовании искусственного интеллекта для работы с текстовыми данными в области иммунологии может быть возможность синтеза графиков и схем, визуализирующих новые сигнальные пути, выявляемые взаимосвязи между разными типами клеток, факторы развития заболеваний, что позволяет синтезировать современные гипотезы в науке. Например, Kirouac D.C. и соавт. (2012) продемонстрированы возможности визуализации протеин-протеино-

вого взаимодействия при воспалении, определены характеристики кинетического/логического моделирования воспалительной и опосредованной рецепторами передачи сигнала.

Таким образом, технологи искусственного интеллекта могут быть полезны в работе над созданием обзора литературы по иммунологии.

Помимо работы с текстами, ИИ может быть использован для статистической обработки данных, полученных в иммунологических исследованиях. В частности, такие сервисы, как Google Colab (<https://colab.research.google.com/>), Julius AI (<https://julius.ai/>), JASP (<https://jasp-stats.org/>) могут быть полезными для изучения результатов собственных исследований, Gnuplot (<http://www.gnuplot.info/>) — для графического представления данных.

Третье большое направление применения искусственного интеллекта в иммунологии — анализ полученных данных, например работа по выявлению закономерностей, вопросы прогнозирования, построения моделей, решение других более сложных задач. К основным областям работы с цифровыми данными можно отнести:

1. Собственно анализ и систематизацию больших объемов сведений, получаемых в результате геномных, транскриптомных, протеомных исследований [10]; многие авторы отмечают, что алгоритмы ИИ, в частности модели глубокого обучения, очень эффективны при анализе результатов высокопроизводительного секвенирования.

2. Прямую и обратную менделевскую рандомизацию, используемую для оценки взаимосвязи однонуклеотидных полиморфизмов (single nucleotide polymorphism, SNP) с фактором риска или фенотипическим признаком (нозологической формой) и для проверки обратной причинно-следственной связи в эпидемиологических исследованиях.

3. Выявление скрытых паттернов и установление корреляционных связей между параметрами, которые могут быть неочевидны при традиционном анализе данных, как представлено в публикации Elste J. и соавт. (2024), а также моделирование межклеточных взаимодействий, например, как в исследовании Kumař A. и соавт. (2024).

4. Идентификацию и классифицирование иммунных клеток в морфологических и гистологических препаратах с экспертной точностью как осуществили Crispino A. и соавт. (2024) в изучении Т-лимфоцитов при плоскоклеточной карциноме полости рта.

5. Прогнозирование иммунного ответа на терапию, вакцинацию, хирургическое лечение [15], поиск биомаркеров, например, старения на основе исследования транскриптомов отдельных клеток [13].

6. Персонализацию рекомендаций по диагностике и лечению с учетом имеющихся иммунологических данных [14] в том числе и на популяционном уровне, как, например, при пандемии COVID-19, когда исследования с привлечением возможностей искусственного интеллекта сыграли решающую роль в анализе иммунных реакций на SARS-CoV-2, что позволило получить ценную информацию для разработки вакцин [2].

Среди возможных сервисов по анализу цифровых данных с привлечением возможностей искусственного интеллекта: Bioconductor (<https://www.bioconductor.org/>) — для биоинформационных исследований, TensorFlow (<https://www.tensorflow.org/>) — для изучения генома, протеома, картирования генов, моделирования распространения инфекции, IBM Watson Studio (<https://www.ibm.com/products/watson-studio>) — для прогнозирования и управления рисками в иммунологии, Bioinformatics.org (<https://www.bioinformatics.org/>) — для анализа, моделирования и визуализации иммунологических данных.

Отдельно можно отметить возможности искусственного интеллекта в освоении иммунологии, как науки. С одной стороны, появилась перспектива быстрого доступа к необходимым данным из разных разделов дисциплины, с другой — способность синтеза ИИ тестов со множественными ответами для проверки полученных знаний [12].

Следующим этапом работы стало изучение потенциала искусственного интеллекта в решении научной задачи. На примере использования моделей GPT v.4.0 выполнен сравнительный анализ синтезированных ИИ с ранее проанализированными и опубликованными данными [1].

Установлено, что модели GPT удобны для получения ответов на конкретные запросы в условиях персонализированной обратной связи. Изучение функциональных возможностей показало наличие положительных и отрицательных сторон взаимодействия (рис. 1, табл. 1).

В целом использование ИИ в научных исследованиях является многообещающим, однако, для получения точных иммунологических сведений и создания оригинального контента требуется профессиональный надзор. Как следствие, несмотря на имеющийся потенциал, применение искусственного интеллекта в иммунологии в настоящее время сталкивается с некоторыми трудностями: имеется сложность в понимании того, на основании чего ИИ делает выводы. Необъективность набора данных, неполные аннотации и вариативность экспериментальных протоколов, могут ограничить точность и обобщаемость прогнозов/прогностических моделей, что пока создает сложности внедрения синтезированных ИИ

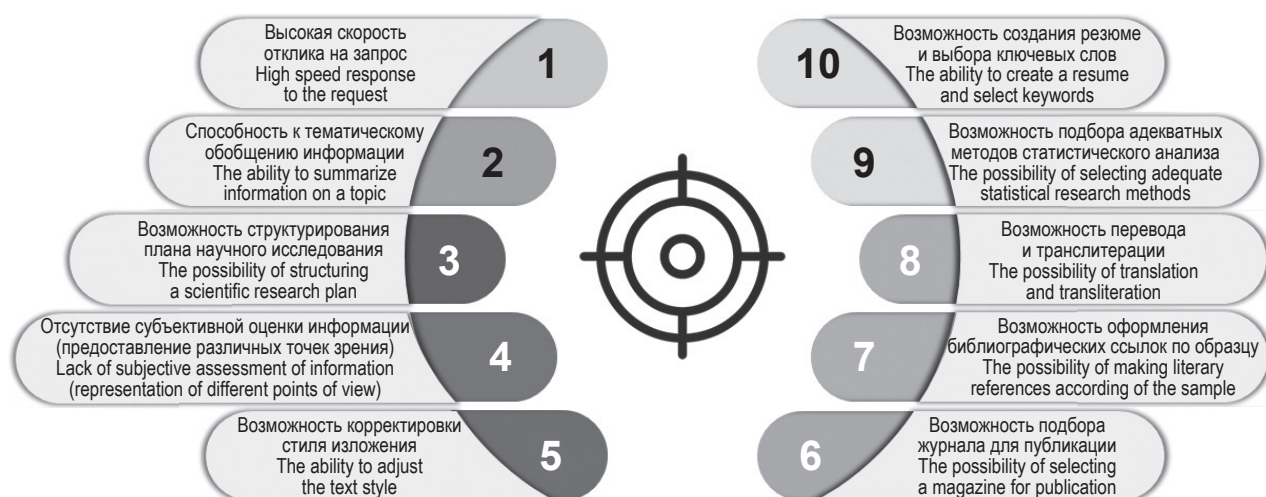


Рисунок 1. Положительные аспекты применения чат-ботов на базе GPT для научных исследований в области иммунологии на примере ранее проанализированных и опубликованных данных

Figure 1. Positive aspects of using GPT-powered chatbots for scientific research in immunology, exemplified by previously analyzed and published data

ТАБЛИЦА 1. ОТРИЦАТЕЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ РЕЗУЛЬТАТОВ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ЧАТОВ НА БАЗЕ GENERATIVE PRE-TRAINED TRANSFORMER В ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ НА ПРИМЕРЕ РАНЕЕ ПРОАНАЛИЗИРОВАННЫХ И ОПУБЛИКОВАННЫХ ДАННЫХ

TABLE 1. NEGATIVE FEATURES OF THE RESULTS OF USING GPT-BASED CHATS IN IMMUNOLOGICAL RESEARCH USING THE EXAMPLE OF PREVIOUSLY ANALYZED AND PUBLISHED DATA

Выявленные особенности Identified features	Пояснение Explanation
Значительная зависимость ответа от стиля формулирования запроса A significant dependence of the response on the way the query is phrased	В той или иной степени варьирует в разных чат-ботах, обусловлена наличием и использованием связи с обучающим набором данных To one degree or another, it varies in different chatbots due to the presence and use of communication with the training dataset
Синтез информации в очень общем виде, возможны повторы для усиления впечатления о раскрытии темы запроса Synthesis of information in a very general way, repetitions are possible to enhance the impression of the disclosure of the subject of the request	Например, ChatGPT в тексте ответа (введение, основная часть и заключение) предлагает три однообразные по смыслу формулировки; среди синтезированных ключевых слов было предложено только одно, состоящее из 1 слова, остальные – словосочетания из 2-3 слов For example, ChatGPT offers three identical formulations in the response text (introduction, main part, and conclusion); among the synthesized keywords, only one consisted of 1 word, while the rest were phrases of 2-3 words
Синтез небольших объемов текста несмотря на запрос полноценной по объему статьи Creating a small text despite the request of a full-length article	При запросе статьи размером в 3000 слов синтезируется текст объемом около 1000 слов; например, Microsoft 365 Copilot может предложить создание только структуры публикации When requesting an article with a length of 3,000 words, a text with approximately 1,000 words will be generated; for instance, Microsoft 365 Copilot might suggest creating only the structure of the publication

Таблица 1 (окончание)
Table 1 (continued)

Выявленные особенности Identified features	Пояснение Explanation
Имеющийся риск плагиата, нет возможности проверить на наличие заимствований онлайн There is a high risk of plagiarism, and there is no way to check for borrowings online	Причина – использование для обучения уже опубликованной информации; например, ChatGPT предлагает перейти на специализированные сервисы для определения наличия заимствований The reason for potential plagiarism is the use of already published information for training; for example, ChatGPT suggests using specialized services to detect instances of plagiarism
Не все чат-боты позволяют синтезировать рисунки, схемы и таблицы Not all chatbots allow the synthesis of drawings, diagrams, and tables	Например, при запросе DeepSeek-R1 иллюстрации к тексту статьи получен ответ: «не могу напрямую создавать или отображать визуальные рисунки или диаграммы, но могу описать их содержание» For example, when requesting DeepSeek-R1 to provide illustrations for the article, the response was: "I cannot directly create or display visual images or diagrams, but I can describe their content"
Большая часть чат-ботов имеет лучшие возможности при работе на языке оригинала (чаще – на английском языке) Most chatbots have better capabilities when working in the original language (most often in English)	Небольшая часть чат-ботов способна к работе на русском языке, но информационные возможности ниже, чем у англоязычных моделей A small number of chatbots are capable of working in Russian, but their informational capabilities are lower compared to English-language models
Возможно самостоятельное синтезирование несуществующих ссылок для обзора литературы Artificial intelligence can independently generate non-existent references for a literature review	Например, предложенная DeepSeek-R1 ссылка: Wang L.L. et al. (2021) "Extracting immune-related gene-disease associations from PubMed using natural language processing." *Bioinformatics*, 37(15), 2121–2129. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btab123 не существует, наиболее близкой по смыслу оказалась работа: Bravo À., Piñero J., Queralt-Rosinach N., Rautschka M., Furlong L.I. Extraction of relations between genes and diseases from text and large-scale data analysis: implications for translational research. BMC, 2015, Bioinformatics, Vol. 16, no. 55. https://doi.org/10.1186/s12859-015-0472-9 For example, the reference suggested by DeepSeek-R1: Wang L.L., et al. (2021). "Extracting immune-related gene-disease associations from PubMed using natural language processing." *Bioinformatics*, 37(15), 2121–2129. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btab123 does not exist, and the closest match in meaning is the paper: Bravo À., Piñero J., Queralt-Rosinach N., Rautschka M., Furlong L.I. Extraction of relations between genes and diseases from text and large-scale data analysis: implications for translational research. BMC, 2015, Bioinformatics, Vol. 16, no. 55 https://doi.org/10.1186/s12859-015-0472-9
Представление ссылок после статьи без упоминания в тексте The references used in the article are located at the end, and there are no citations in the text	Предложенные Qwen chat ссылки приводились только в конце текста статьи The references suggested by Qwen chat were placed only at the end of the article
Не определены условия публикации научных материалов, полученных путем использования ИИ The conditions for publishing scientific materials obtained through the use of AI have not been defined	При публикации статей в журналах требуется указывать использование ИИ при подготовке работы When publishing articles in journals, it is required to specify the use of AI in the preparation of the work

сведений в науку и практику. Вместе с тем, интеграция ИИ в иммунологические исследования, например, появляющиеся специализированные чат-боты, работающие с медико-биологическими данными, или такие флагманские модели, такие как Grok-3 и в целом модели следующего поколения (v.5.0), открывают огромные перспективы для улучшения нашего понимания иммунной системы и разработки новых терапевтических стратегий.

Выводы

1. Искусственный интеллект может преобразовать иммунологические исследования, позволяя проводить более эффективный обзор литературы и более глубокий анализ данных, однако на начальных этапах требуется экспертный надзор.

2. Несмотря на сохраняющиеся проблемы, постоянное развитие и ответственное использование инструментов, ИИ может ускорить открытия и улучшить результаты лечения пациентов.

3. По мере развития технологий искусственного интеллекта они станут неотъемлемой частью инструментария иммунолога.

Авторский комментарий

В ходе подготовки этой статьи для генерации ответов на некоторые вопросы, подбора синонимичных замен и сравнительного исследования с ранее полученными данными [1] был использован GPT v.4.0, вместе с тем весь созданный ИИ контент полностью редактировался в соответствии со стилистикой автора.

Автор несет полную ответственность за содержание публикации.

Список литературы / References

1. Бердюгина О.В., Гусев Е.Ю. Холекальциферол в роли средства неспецифической иммунопрофилактики COVID-19 // Медицинская иммунология, 2023, Т. 25, № 4. С. 823-830. [Berdiugina O.V., Gusev E.Yu. Cholecalciferol as a means of nonspecific immunoprophylaxis against COVID-19. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2023, Vol. 25, no. 4, pp. 823-830. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-CAA-2849.
2. Abd-Alrazaq A., Schneider J., Mifsud B., Alam T., Househ M., Hamdi M., Shah Z. A comprehensive overview of the COVID-19 literature: machine learning-based bibliometric analysis. *J. Med. Internet Res.*, 2021, Vol. 23, no. 3, e23703. doi: 10.2196/23703.
3. Crispino A., Varricchio S., Ilardi G., Russo D., Di Crescenzo R.M., Staibano S., Merolla F. A Digital workflow for automated assessment of tumor-infiltrating lymphocytes in oral squamous cell carcinoma using QuPath and a StarDist-based model. *Pathologica*, 2024, Vol. 116, no. 6, pp. 390-403.
4. D'Elia D., Truu J., Lahti L., Berland M., Papoutsoglou G., Ceci M., Zomer A., Lopes M.B., Ibrahim E., Gruca A., Nechyporenko A., Frohme M., Klammersteiner T., Pau E.C.S., Marcos-Zambrano L.J., Hron K., Pio G., Simeon A., Suharoschi R., Moreno-Indias I., Temko A., Nedyalkova M., Apostol E.-S., Truică C.-O., Shigdel R., Telalović J.H., Bongcam-Rudloff E., Przymus P., Jordamović N.B., Falquet L., Tarazona S., Sampri A., Isola G., Pérez-Serrano D., Trajković V., Klucar L., Loncar-Turukalo T., Havulinna A.S., Jansen C., Bertelsen R.J., Claesson M.J. Advancing microbiome research with machine learning: key findings from the ML4Microbiome COST action. *Front. Microbiol.*, 2023, Vol. 14, 1257002. doi: 10.3389/fmicb.2023.1257002.
5. Elste J., Saini A., Mejia-Alvarez R., Mejía A., Millán-Pacheco C., Swanson-Mungerson M., Tiwari V. Significance of artificial intelligence in the study of virus-host cell interactions. *Biomolecules*, 2024, Vol. 14, no. 8, 911. doi: 10.3390/biom14080911.
6. Gupta L., Gasparyan A.Y., Misra D.P., Agarwal V., Zimba O., Yessirkepov M. Information and misinformation on COVID-19: a cross-sectional survey study. *J. Korean Med. Sci.*, 2020, Vol. 35, no. 27, e256. doi: 10.3346/jkms.2020.35.e256.
7. Kirouac D.C., Saez-Rodriguez J., Swantek J., Burke J.M., Lauffenburger D.A., Sorger P.K. Creating and analyzing pathway and protein interaction compendia for modelling signal transduction networks. *BMC Syst. Biol.*, 2012, Vol. 6, 29. doi: 10.1186/1752-0509-6-29.
8. Kryś J.D., Głowacki M., Śmieja P., Gront D. deepBBQ: A deep learning approach to the protein backbone reconstruction. *Biomolecules*, 2024, Vol. 14, no. 11, 1448. doi: 10.3390/biom14111448.
9. Kumar A., Dixit S., Srinivasan K., M D., Vincent P.M.D.R. Personalized cancer vaccine design using AI-powered technologies. *Front. Immunol.*, 2024, Vol. 15, 1357217. doi: 10.3389/fimmu.2024.1357217.
10. Liang X., Zhou R., Li Y., Yang L., Su M., Lai K.P. Clinical characterization and therapeutic targets of vitamin A in patients with hepatocholangiocarcinoma and coronavirus disease. *Aging*, 2021, Vol. 13, no. 12, pp. 15785-15800. doi: 10.18632/aging.203220.
11. Mohammad Piri S., Amin Habibi M., Shool S., Khazaeli Najafabadi M., Ahmadvpour S., Alemi F., Aria Nejadghaderi S., Shokri P., Abdi M., Asghari N., Amir Asef-Agah S., Tavakolpour S. Role of T follicular helper cells in autoimmune rheumatic Diseases: A systematic review on immunopathogenesis and response to treatment. *Hum. Immunol.*, 2024, Vol. 85, no. 5, 110838. doi: 10.1016/j.humimm.2024.110838.

12. Stadler M., Horrer A., Fischer M.R. Crafting medical MCQs with generative AI: A how-to guide on leveraging ChatGPT. *GMS J. Med. Educ.*, 2024, Vol. 41, no. 2, 20. doi: 10.3205/zma001675.
13. Wolf J., Rasmussen D.K., Sun Y.J., Vu J.T., Wang E., Espinosa C., Bigini F., Chang R.T., Montague A.A., Tang P.H., Mruthyunjaya P., Aghaeepour N., Dufour A., Bassuk A.G., Mahajan V.B. Liquid-biopsy proteomics combined with AI identifies cellular drivers of eye aging and disease in vivo. *Cell*, 2023, Vol. 186, no. 22, pp. 4868-4884.e12.
14. Wong D.S.H., Santos A.F. The future of food allergy diagnosis. *Front. Allergy*, 2024, Vol. 5, 1456585. doi: 10.3389/falgy.2024.1456585.
15. Xiang Z., Hu J., Bu S., Ding J., Chen X., Li Z. Machine learning based prediction models for the prognosis of COVID-19 patients with DKA. *Sci. Rep.*, 2025, Vol. 15, no. 1, 2633. doi: 10.1038/s41598-025-85357-9.

Автор:

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

Author:

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

Поступила 27.02.2025
Отправлена на доработку 01.05.2025
Принята к печати 25.05.2025

Received 27.02.2025
Revision received 01.05.2025
Accepted 25.05.2025

НОВЫЙ ПОДХОД К АНАЛИЗУ КЛЕТОЧНОГО ЦИКЛА Т-ЛИМФОЦИТОВ МЕТОДОМ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ

Сайдакова Е.В.

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

Резюме. Способность Т-лимфоцитов к интенсивной пролиферации является основой формирования как естественного, так и поствакцинального иммунитета. Соответственно, нарушение деления Т-клеток может отражаться на восприимчивости человека к заболеваниям и эффективности вакцинации. Подход, который позволит определять не только долю делящихся клеток и активность пролиферации, но и фазы клеточного цикла, значительно расширит возможности исследования причин и механизмов нарушения деления Т-лимфоцитов. Цель — апробировать новый подход к анализу клеточного цикла Т-лимфоцитов разной степени зрелости с использованием проточной цитометрии. Объектом исследования служила периферическая кровь, полученная от здоровых доноров. Мононуклеарные клетки периферической крови выделяли центрифугированием в градиенте плотности диаколл стандартным методом и стимулировали фитогемагглютинином, после чего культивировали в течение 4 суток (37 °C, 5% CO₂). Активированные лейкоциты окрашивали витальным красителем LIVE/DEAD Fixable Violet Dead Cell Stain и антителами CD3 BV605, CD4 PE, CD8 BV510, CCR7 PE/Cy7 и CD45RO APC-eF780. Клетки фиксировали и пермеабилizировали, после чего окрашивали антителами к pRb AF488 и pHH3 AF647, а также красителем DAPI. Анализ клеток проводили на проточном цитометре CytoFLEX S. Установлено, что предложенный подход позволяет различать Т-лимфоциты, находящиеся в G₀, G₁, S, G₂ и M-фазах клеточного цикла. Более того, разработанная панель флуоресцентных красителей и антител позволяет одновременно идентифицировать CD4⁺ и CD8⁺Т-клетки различной степени зрелости. Так, в пилотном исследовании было установлено количество CD4⁺ и CD8⁺Т-лимфоцитов, вступивших в активные фазы клеточного цикла, и особенности их распределения по фазам. Также были выявлены отличия паттернов пролиферации наивных CD4⁺ и CD8⁺Т-лимфоцитов, соответствующих клеток центральной и эффекторной памяти, а также терминальных эффекторов. Предложенный метод позволяет проводить комплексный анализ клеточного цикла CD4⁺ и CD8⁺Т-лимфоцитов разной степени зрелости с использованием проточной цитометрии.

Ключевые слова: CD4⁺Т-лимфоциты, CD8⁺Т-лимфоциты, наивные клетки, клетки памяти, клеточный цикл, проточная цитометрия

Адрес для переписки:

Сайдакова Евгения Владимировна
Институт экологии и генетики микроорганизмов
Уральского отделения Российской академии наук
614081, Россия, г. Пермь, ул. Голева, 13.
Тел.: 8 (342) 280-83-34.
Факс: 8 (342) 280-92-11.
E-mail: radimira@list.ru

Address for correspondence:

Evgeniya V. Saidakova
Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms
13 Golev St
Perm
614081 Russian Federation
Phone: +7 (342) 280-83-34.
Fax: +7 (342) 280-92-11.
E-mail: radimira@list.ru

Образец цитирования:

Е.В. Сайдакова «Новый подход к анализу клеточного цикла Т-лимфоцитов методом проточной цитометрии» // Российский иммунологический журнал, 2025. Т. 28, № 3. С. 363-368.
doi: 10.46235/1028-7221-17127-NAT

© Сайдакова Е.В., 2025

Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

E.V. Saidakova "Novel approach to cell cycle analysis of T lymphocytes using flow cytometry", Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2025, Vol. 28, no. 3, pp. 363-368.
doi: 10.46235/1028-7221-17127-NAT

© Saidakova E.V., 2025

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

DOI: 10.46235/1028-7221-17127-NAT

NOVEL APPROACH TO CELL CYCLE ANALYSIS OF T LYMPHOCYTES USING FLOW CYTOMETRY

Saidakova E.V.

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

Abstract. Intensive proliferation of T lymphocytes is essential for the development of both natural and vaccine-induced immunity. As a result, impaired T cell proliferation could influence disease susceptibility and vaccination effectiveness. A methodology enabling definition of dividing cells fraction, proliferation rate, as well as the cell cycle phases, would substantially enhance our understanding of the causes and mechanisms underlying impaired T lymphocyte division. The aim of our study was to validate a novel approach for analyzing cell cycle of T lymphocytes at different maturation stages via flow cytometry. The study was performed with peripheral blood samples collected from healthy individuals. Peripheral blood mononuclear cells were isolated by density-gradient centrifugation, stimulated with phytohemagglutinin, and cultivated for 4 days under standard conditions (37 °C, 5% CO₂). Activated leukocytes were labeled with the LIVE/DEAD Fixable Violet Dead Cell Stain and antibodies specific for CD3 BV605, CD4 PE, CD8 BV510, CCR7 PE/Cy7, and CD45RO APC-eF780. The fixed and permeabilized cells were further stained with antibodies targeting pRb AF488 and pHH3 AF647, along with the DAPI nuclear stain. Flow cytometric analysis was conducted using a CytoFLEX S instrument. The proposed technique allowed successful distinction between T lymphocytes in G₀, G₁, S, G₂, and M phases of the cell cycle. Moreover, the designed fluorescence panel permits concurrent detection of CD4⁺ and CD8⁺T cells at diverse maturation states. During the pilot study, we have quantified the numbers of CD4⁺ and CD8⁺T lymphocytes progressing into active cell cycle phases, along with their phase-specific distributions. The differences in proliferation dynamics were also observed for naive CD4⁺ and CD8⁺T lymphocytes, central memory, effector memory, and terminal effector subsets. The proposed method enables comprehensive evaluation of the cell cycle progression in CD4⁺ and CD8⁺T lymphocytes across distinct maturation stages by means of flow cytometry.

Keywords: CD4⁺T lymphocytes, CD8⁺T lymphocytes, naive cells, memory cells, cell cycle, flow cytometry

Работа выполнена в рамках государственного задания № 124021900006-5.

Введение

Т-лимфоциты играют важную роль в адаптивном иммунном ответе, обеспечивая защиту от инфекций, опухолей и аутоиммунных заболеваний. Способность этих клеток циркулировать в организме в течение продолжительного времени и резко увеличивать свое количество при столкновении с патогеном является основой формирования стойкого поствакцинального иммунитета [6, 7, 11]. Соответственно, нарушение деления Т-лимфоцитов может отражаться на эффективности вакцинации и способности противостоять заболеваниям различного генеза.

В настоящее время для изучения пролиферации Т-лимфоцитов применяются несколько подходов, задействующих проточную цитометрию. Первый — окрашивание клеток 5(6)-карбоксифлуоресцеин диацетат-N-сукцинимидиловым эфиром (CFSE) или его аналогами [2]. Эти флуоресцентные красители способны проникать внутрь клеток и образовывать стабильные ковалентные

связи с аминокруппами белков. При каждом делении меченные красителем родительские белки равномерно распределяются между дочерними лимфоцитами. Это приводит к дискретному снижению интенсивности флуоресценции, что позволяет отслеживать количество делений клеток. Второй подход — добавление в среду для культивирования аналога тимидина 5-бromo-2'-дезоксинуридина (BrdU) [9]. Пролиферирующие лимфоциты включают его в состав ДНК дочерних клеток во время синтеза новой цепи (S-фаза клеточного цикла), что позволяет идентифицировать активно делящиеся клетки по наличию в их генетическом материале синтетического нуклеотида. Для обнаружения инкорпорированного BrdU используются меченные флуорохромами моноклональные антитела. Этот подход позволяет определить долю пролиферирующих клеток в популяции и проанализировать количество клеток в S-фазе. Третий подход — детекция внутриклеточных и поверхностных белков, характерных для делящихся иммунных клеток [8]. Такие молекулы, как Ki-67 и CD71, экспрессируются в активных фазах клеточного цикла и не

присутствуют на покоящихся лимфоцитах [1]. Для детекции эти белки также окрашивают флуоресцентными моноклональными антителами. Метод позволяет оценить количество пролиферирующих Т-лимфоцитов. Четвертый подход — оценка содержания нуклеиновых кислот в пролиферирующих клетках с использованием флуоресцентных красителей, способных связываться с двуспиральной ДНК пропорционально ее количеству, таких как 4',6-диамидино-2-фенилиндол (DAPI) [5]. Так как в процессе деления содержание ДНК временно увеличивается, метод позволяет отличить клетки с диплоидным набором хромосом (2n) от клеток, удвоивших их количество в процессе митоза (4n).

Несмотря на разнообразие, вышеописанные подходы не позволяют оценить эффективность прохождения клетками отдельных фаз клеточного цикла. Более того, не каждая методология дает возможность идентифицировать субпопуляционную принадлежность анализируемых клеток. Наличие метода, позволяющего одновременно анализировать фенотип и фазу клеточного цикла, значительно расширит возможности исследователей.

Цель настоящей работы — апробировать новый подход к анализу клеточного цикла Т-лимфоцитов методом проточной цитометрии.

Материалы и методы

Объектом исследования служили мононуклеарные клетки, полученные от относительно здоровых доноров крови ($n = 3$). Проведение исследования было одобрено этическим комитетом ИЭГМ УрО РАН (рег. № комитета IRB00010009). Каждый участник подписал информированное согласие.

Кровь объемом до 10 мл забирали натощак из кубитальной вены в вакуумные пробирки, содержащие литий гепарин (Weihai Hongyu Medical Devices Cj., Ltd, Китай).

Мононуклеарные клетки выделяли путем центрифугирования двукратно разведенной фосфатно-солевым буферным раствором Дульбекко (DPBS, Gibco, США) крови в градиенте плотности Диаколл (1,077 г/мл, ООО «Диаэм», Россия). Выделенные клетки собирали, дважды отмывали раствором DPBS, подсчитывали в камере Горяева.

Выделенные клетки стимулировали фитогемагглютинином (ФГА, Serva, Германия) в конечной концентрации 15 мкг/мл. Лейкоциты культивировали в 96-луночных планшетах (Costar, США) в полной питательной среде (ППС), содержащей RPMI-1640 (BioinnLabs, Россия), 10% ЭТС, 100 Ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл

стрептомицина (Thermo Fisher Scientific, Inc., США), в течение 4 суток (37 °C, 5% CO₂). По окончании времени инкубации клетки собирали и для фенотипического анализа окрашивали витальным красителем LIVE/DEAD™ Fixable Violet Dead Cell Stain (LD, Life Technologies, США) и коктейлем анти-CD3-BV605, анти-CD4-PE, анти-CD8-BV510, анти-CCR7-PE/Cy7 (BioLegend, США) и анти-CD45RO-APC-eF780 (Invitrogen, США) антител. После этого образцы фиксировали холодным раствором Fixation Buffer (BioLegend, США) в течение 20 мин в темноте и дважды отмывали избыточным объемом раствора DPBS, содержащим 1% бычьего сывороточного альбумина (BSA, Sigma-Aldrich, США). Зафиксированные клетки пермеабелизовали с использованием True-Phos Perm Buffer (BioLegend, США) в течение 1 ч и дважды отмывали избыточным объемом DPBS/1% BSA. Пробы окрашивали DAPI (BioLegend, США), анти-pRb-AF488 (BD Biosciences, США) и анти-pHH3-AF647 (BioLegend, США) антителами. Окрашенные клетки анализировали с использованием проточного цитометра CytoFLEX S (Beckman Coulter, США).

Визуализацию данных проводили с помощью программного обеспечения FlowJo 10.3 (FlowJo LLC, США).

Результаты и обсуждение

Лейкоциты гейтировали последовательно. По параметрам прямого (FSC) и бокового (SSC) светорассеяния выделяли регион лимфоцитов. Затем внутри этого региона выделяли клетки, умеренно окрашенные витальным красителем. Интенсивно окрашенные — «мертвые» клетки, мембрана которых ввиду повреждений допустила проникновение красителя — вносят погрешность в получаемые результаты [10] и потому были исключены из анализа. Среди оставшихся жизнеспособных клеток по наличию поверхностной молекулы CD3 идентифицировали Т-лимфоциты.

Один из существующих вариантов оценки пролиферации Т-лимфоцитов предполагает окраску интеркалирующими красителями, такими как DAPI. Этот краситель, связываясь с АТ-кластерами в малой бороздке двухцепочечной ДНК, флуоресцирует после облучения лазером. Яркость свечения пропорциональна количеству связанного красителя и, следовательно, содержанию ДНК в клетке. Лимфоциты с набором 4n (G2- и М-фазы клеточного цикла) светятся в два раза ярче, чем клетки с содержанием ДНК 2n (G0- и G1-фазы). Промежуточной флуоресценцией характеризуются клетки, находящиеся в S-фазе клеточного цикла (рис. 1).

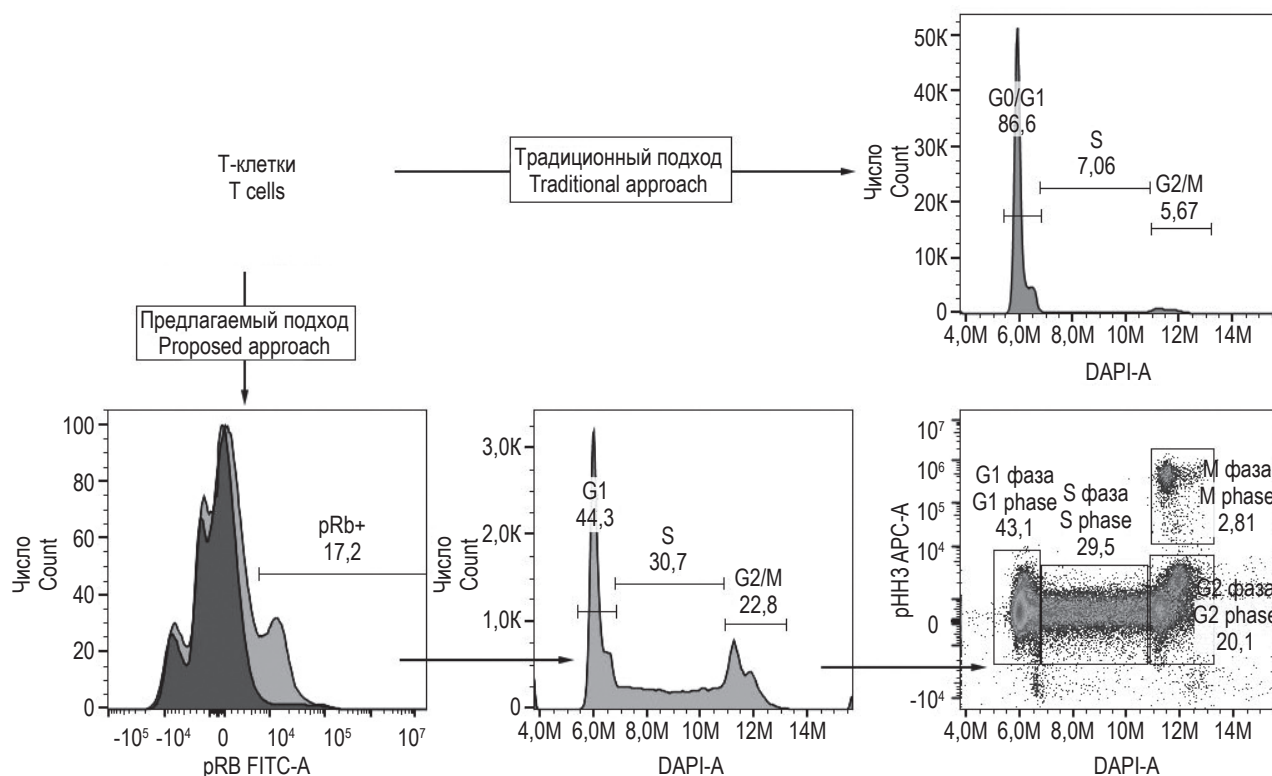


Рисунок 1. Традиционный и предлагаемый подход к анализу клеточного цикла Т-лимфоцитов

Figure 1. Traditional and proposed approaches to analyzing the T lymphocyte cell cycle

Для того чтобы отделить G0- от G1- и G2- от М-фазы клеточного цикла, нами было предложено ввести два дополнительных маркера: фосфорилированный белок ретинобластомы (pRb) и фосфорилированный гистон H3 (pH3). Белок ретинобластомы фосфорилируется при переходе клеток в активные фазы клеточного цикла [3], следовательно, лимфоциты в G1-, S-, G2- и М-фазах имеют фенотип pRb⁺. Полученные нами данные показали, что гейтирование pRb требует введения дополнительного контроля (флуоресценция минус один, FMO) для точного определения границы региона. В свою очередь, гистон H3 фосфорилируется при переходе из G2- в М-фазу клеточного цикла [4]. Согласно полученным нами результатам, уровень экспрессии pH3 достаточно высок и не требует введения дополнительных контролей.

Предлагаемый метод оценки фаз клеточного цикла был апробирован на CD4⁺ и CD8⁺Т-лимфоцитах различной степени зрелости: CCR7⁺CD45RO⁻ — наивные лимфоциты; CCR7⁺CD45RO⁺ — клетки центральной памяти; CCR7⁻CD45RO⁺ — клетки эффекторной памяти; CCR7⁻CD45RO⁻ — терминально дифференцированные элементы. В результате было показано следующее. Приблизительно равное число CD4⁺ и CD8⁺Т-клеток экспрессирует pRb после 4 суток

культивирования с ФГА: 22,5% и 20,5% соответственно. При этом было отмечено неодинаковое распределение CD4⁺ и CD8⁺Т-лимфоцитов по фазам клеточного цикла (табл. 1). Так, основная часть CD4⁺Т-клеток была представлена лимфоцитами в G1-фазе. Напротив, для CD8⁺Т-лимфоцитов было характерно более равномерное распределение между G1, S и G2-фазами. По-видимому, это отражает более высокую митотическую активность цитотоксических Т-лимфоцитов по сравнению с хелперными клетками.

Среди CD4⁺Т-лимфоцитов в каждой исследованной нами субпопуляции распределение клеток между фазами клеточного цикла было единообразным и совпадало с таковым в общем пуле. В то же время среди субпопуляций CD8⁺Т-лимфоцитов был выявлен ряд особенностей. Так, большинство клеток, находящихся в М-фазе, было представлено в субпопуляциях эффекторной памяти и терминально-дифференцированных клеток (в среднем 9,8%). Среди наивных лимфоцитов и клеток центральной памяти их количество было существенно ниже и в среднем составило 0,8%. При этом в S-фазе клеточного цикла пул лимфоцитов, относящихся к наивным и центральной памяти, был увеличен по сравнению с таковым у более дифференцированных

ТАБЛИЦА 1. РАСПРЕДЕЛЕНИЕ СТИМУЛИРОВАННЫХ Т-ЛИМФОЦИТОВ ПО ФАЗАМ КЛЕТОЧНОГО ЦИКЛА

TABLE 1. THE DISTRIBUTION OF STIMULATED T LYMPHOCYTES ACROSS CELL CYCLE PHASES

Фаза клеточного цикла Cell cycle phase	CD4 ⁺ Т-клетки CD4 ⁺ T cells	CD8 ⁺ Т-клетки CD8 ⁺ T cells
G1-фаза, % G1 phase, %	87,7	41,7
S-фаза, % S phase, %	9,7	31,6
G2-фаза, % G2 phase, %	0,3	20,7
M-фаза, % M phase, %	0,01	2,8

форм (в среднем 35,2% против 22,7%). Полученные результаты подтверждают сделанное ранее предположение о более высокой, чем у CD4⁺Т-лимфоцитов митотической активности CD8⁺Т-клеток. Более того, в пуле цитотоксических Т-лимфоцитов, по-видимому, интенсивно делятся более зрелые элементы: клетки эффекторной памяти и терминально-дифференцированные лимфоциты.

Выводы

Предлагаемый метод позволяет проводить оценку фаз клеточного цикла в CD4⁺ и CD8⁺Т-лимфоцитах разной степени зрелости. Метод может быть весьма информативен при изучении того, как различные субпопуляции Т-клеток

реагируют на антигенную стимуляцию, какие факторы влияют на их пролиферацию и как эти процессы связаны с формированием иммунной памяти. Это может внести вклад в понимание механизмов формирования поствакцинального и противоопухолевого иммунитета.

Благодарности

В работе использовано оборудование ЦКП «Исследования материалов и вещества» ПФИЦ УрО РАН. Автор выражает глубокую благодарность младшему научному сотруднику лаборатории молекулярной иммунологии ИЭГМ УрО РАН Власовой В.В. и научному сотруднику лаборатории экологической иммунологии ИЭГМ УрО РАН Королевской Л.Б.

Список литературы / References

1. Марченко Д.М., Сайдакова Е.В. Новые маркеры для исследования пролиферации Т-лимфоцитов человека // Вестник Пермского университета. Серия «Биология», 2021. № 4, С. 316-323. [Marchenko D.M., Saidakova E.V. Novel human T-cell proliferation markers. *Vestnik Permskogo universiteta. Seriya "Biologiya"* = *Bulletin of Perm University. Biology*, 2021, no. 4, pp. 316-323. (In Russ.)]
2. Banks H.T., Sutton K.L., Thompson W.C., Bocharov G., Roose D., Schenkel T., Meyerhans A. Estimation of cell proliferation dynamics using CFSE data. *Bull. Math. Biol.*, 2011, Vol. 73, no. 1, pp. 116-150.
3. Cooper S., Shayman J.A. Revisiting retinoblastoma protein phosphorylation during the mammalian cell cycle. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2001, Vol. 58, no. 4, pp. 580-595.
4. Crosio C., Fimia G.M., Loury R., Kimura M., Okano Y., Zhou H., Sen S., Allis C.D., Sassone-Corsi P. Mitotic phosphorylation of histone H3: spatio-temporal regulation by mammalian Aurora kinases. *Mol. Cell. Biol.*, 2002, Vol. 22, no. 3, pp. 874-885.
5. Darzynkiewicz Z. Critical aspects in analysis of cellular DNA content. *Curr. Protoc. Cytom.*, 2011, Chapter 7, pp. 721-728.
6. Kalimuddin S., Tham C.Y.L., Chan Y.F.Z., Hang S.K., Kunasegaran K., Chia A., Chan C.Y.Y., Ng D.H.L., Sim J.X.Y., Tan H.-C., Syenina A., Ngoh A.Q., Hamis N.Z., Chew V., Leong Y.S., Yee J.X., Low J.G., Chan K.R., Ong E.Z., Bertolotti A., Ooi E.E. Vaccine-induced T cell responses control Orthoflavivirus challenge infection without neutralizing antibodies in humans. *Nat. Microbiol.*, 2025, Vol. 10, no. 2, pp. 374-387.
7. Kim C., Fang F., Weyand C.M., Goronzy J.J. The life cycle of a T cell after vaccination – where does immune ageing strike? *Clin. Exp. Immunol.*, 2017, Vol. 187, no. 1, pp. 71-81.
8. Motamedi M., Xu L., Elahi S. Correlation of transferrin receptor (CD71) with Ki67 expression on stimulated human and mouse T cells: The kinetics of expression of T cell activation markers. *J. Immunol. Methods*, 2016, Vol. 437, pp. 43-52.

9. Rothaeusler K., Baumgarth N. Assessment of cell proliferation by 5-bromodeoxyuridine (BrdU) labeling for multicolor flow cytometry. *Curr. Protoc. Cytom.*, 2007, Chapter 7, Unit 7.31. doi: 10.1002/0471142956.cy0731s40.
10. Schmid I., Ferbas J., Uittenbogaart C.H., Giorgi J.V. Flow cytometric analysis of live cell proliferation and phenotype in populations with low viability. *Cytometry*, 1999, Vol. 35, no. 1, pp. 64-74.
11. Wang L., Nicols A., Turtle L., Richter A., Duncan C.J., Dunachie S.J., Klenerman P., Payne R.P. T cell immune memory after COVID-19 and vaccination. *BMJ Med.*, 2023, Vol. 2, no. 1, e000468. doi: 10.1136/bmjmed-2022-000468.

Автор:

Сайдакова Е.В. — д.б.н., доцент, заведующая лабораторией молекулярной иммунологии, Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук — филиал ФГБУН «Пермский федеральный исследовательский центр» Уральского отделения Российской академии наук, г. Пермь, Россия

Author:

Saidakova E.V., PhD, MD (Biology), Associate Professor, Head, 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 19.03.2025

Отправлена на доработку 09.05.2025

Принята к печати 25.05.2025

Received 19.03.2025

Revision received 09.05.2025

Accepted 25.05.2025

БЕЛКИ-МИШЕНИ МЕЛАТОНИНА: ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ И ФУНКЦИИ

Глебездина Н.С.

*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. Мелатонин (N-ацетил-5-метокситриптамиин) — основной гормон эпифиза, однако его синтез также происходит в различных экстрапинеальных тканях, включая головной мозг, сетчатку, ретинальный пигментный эпителий, желудочно-кишечный тракт, костный мозг, тимус, лимфоциты и кожу. Мелатонин представляет собой амфифильное производное индола, сочетающее гидрофильные (метильная и амидная группы) и гидрофобные (индольное ядро) молекулярные домены. Благодаря уникальной структуре, обеспечивающей высокую биодоступность, а также присутствию гормона и ферментных механизмов для его синтеза в различных органах и тканях, мелатонин участвует в регуляции многочисленных физиологических процессов, что подчеркивает его значительную роль в поддержании системного гомеостаза. Плейотропные эффекты мелатонина обусловлены комбинацией его прямых молекулярных взаимодействий и опосредованных регуляторных механизмов. С одной стороны, мелатонин проявляет свойства мощного эндогенного антиоксиданта, способного напрямую нейтрализовать реактивные формы кислорода и азота. С другой стороны, его физиологические эффекты реализуются через связывание со специфическими белковыми мишенями, а также через вторичные механизмы, включая активацию антиоксидантной защиты, метаболическую и эпигенетическую модуляцию. Однако особый интерес вызывает взаимодействие гормона с многочисленными вне- и внутриклеточными молекулярными мишенями, аффинность связывания с которыми варьируется в широком диапазоне концентраций. Исследования последних десятилетий идентифицировали около двух десятков различных белковых мишеней мелатонина, охватывающих широкий спектр функциональных категорий — от наиболее охарактеризованных рецепторов (мембранных и ядерных) до неканонических мишеней: ферментов (хинонредуктаза-2, металлопротеиназа-9, фосфопроteinфосфатаза-2A, пепсин), ионных каналов, транспортных и структурных белков (транспортер глюкозы Glut1, олигопептидные транспортеры PEPT1 и PEPT2, сывороточный альбумин, тубулин), белков-акцепторов кальция (кальмодулин, протеинкиназа C, кальретикулин). Поиск мишеней мелатонина продолжается, в частности, предполагают, что гормон, помимо опосредованного влияния, способен напрямую модулировать активность мембранного белка резистентности Р-гликопротеина и NAD⁺-зависимых деацетилаз — сиртуинов SIRT1 и SIRT3. Изучение мишеней мелатонина важно для анализа его фармакодинамических эффектов, а поиск новых открывает перспективы для понимания внециркадных функций гормона, таких как нейропротекция, антиканцерогенез и модуляция метаболизма.

Ключевые слова: мелатонин, рецепторы, ферменты, молекулярные мишени, аффинность связывания

Адрес для переписки:

Глебездина Наталья Сергеевна
Институт экологии и генетики микроорганизмов
Уральского отделения Российской академии наук
614081, Россия, г. Пермь, ул. Голева, 13.
Тел.: 8 (342) 280-84-31.
Факс: 8 (342) 280-92-11.
E-mail: glebezдина_n@mail.ru

Address for correspondence:

Natalia S. Glebezдина
Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms
13 Golev St
Perm
614081 Russian Federation
Phone: +7 (342) 280-84-31.
Fax: +7 (342) 280-92-11.
E-mail: glebezдина_n@mail.ru

Образец цитирования:

Н.С. Глебездина «Белки-мишени мелатонина:
взаимодействие и функции» // Российский
иммунологический журнал, 2025. Т. 28, № 3. С. 369-374.
doi: 10.46235/1028-7221-17210-MTP

© Глебездина Н.С., 2025

Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

N.S. Glebezдина "Melatonin target proteins: Interactions
and functions", Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy
Immunologicheskii Zhurnal, 2025, Vol. 28, no. 3, pp. 369-374.
doi: 10.46235/1028-7221-17210-MTP

© Glebezдина N.S., 2025

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

DOI: 10.46235/1028-7221-17210-MTP

MELATONIN TARGET PROTEINS: INTERACTIONS AND FUNCTIONS

Glebezina N.S.

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

Abstract. Melatonin (N-acetyl-5-methoxytryptamine) is the primary hormone of the pineal gland. However its synthesis also occurs in various extra-pineal tissues, including brain, retina, retinal pigment epithelium, gastrointestinal tract, bone marrow, thymus, lymphocytes, and skin. Melatonin is an amphiphilic indole derivative that combines hydrophilic (methyl and amide groups) and hydrophobic (indole core) molecular domains. Due to its unique structure, which ensures high bioavailability, and presence of hormone and enzymatic mechanisms for its synthesis in various organs and tissues, melatonin is involved in regulating numerous physiological processes, thus highlighting its significant role in maintaining systemic homeostasis. The pleiotropic effects of melatonin are due to a combination of its direct molecular interactions and mediated regulatory mechanisms. On the one hand, melatonin is a powerful endogenous antioxidant capable of directly neutralizing reactive oxygen and nitrogen species. On the other hand, its physiological effects are realized through binding to specific protein targets, as well as via secondary mechanisms, including activation of antioxidant defense, metabolic, and epigenetic modulation. Interaction of this hormone with numerous extracellular and intracellular molecular targets is of particular interest, with binding affinity varying across a wide range of concentrations. Numerous studies over recent decades have identified about twenty distinct protein targets of melatonin, spanning a broad spectrum of functional categories — from well-characterized receptors (both membrane-bound and nuclear) to some non-canonical targets. The latter include: enzymes (quinone reductase-2, matrix metalloproteinase-9, protein phosphatase-2A, pepsin), ion channels, transport and structural proteins (glucose transporter GLUT1, oligopeptide transporters PEPT1 and PEPT2, serum albumin, tubulin), calcium-binding proteins (calmodulin, protein kinase C, calreticulin). Recently, the search for melatonin targets is continued. It is suggested that, in addition to its mediated effects, the hormone may directly modulate activity of P-glycoprotein, a membrane drug resistance protein and NAD⁺-dependent deacetylases — sirtuins SIRT1 and SIRT3. Studying the melatonin targets is crucial for analyzing its pharmacodynamic effects. A search for new targets opens perspectives for understanding its non-circadian functions of this hormone, e.g., neuroprotection, anticancer effects, and metabolic modulation.

Keywords: melatonin, receptors, enzymes, molecular targets, binding affinity

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

Введение

Мелатонин — универсальная молекула, широко распространенная в природе и вырабатываемая многими живыми организмами [7, 15]. Это основной гормон эпифиза. После попадания в кровоток он действует как эндокринный фактор и химический посредник света и темноты (циркадный и цирканнуальный пейсмейкер). Кроме того, гормон синтезируется в различных экстрапинеальных органах, включая мозг, сетчатку, ретинальный пигментный эпителий, желудочно-кишечный тракт, костный мозг, тимус, лимфоциты и кожу, действуя как паракринный или аутокринный медиатор [7, 15]. Гормон обладает

плейотропным действием, играя решающую роль в регулировании цикла сна и бодрствования, а также выступая в роли антиоксиданта. Важное воздействие мелатонин оказывает на онкостатическую активность, противовоспалительные эффекты, иммунные, репродуктивные процессы, на нейропротекцию, метаболическую регуляцию, на сердечно-сосудистую систему, функцию желудочно-кишечного тракта, здоровье костей, защиту кожи, на половое созревание, на настроение и психическое здоровье [7, 15]. Эти разнообразные эффекты подчеркивают важность мелатонина в поддержании гомеостаза и общего состояния здоровья. Предполагают, что они реализуются благодаря липофильному индольному кольцу и малым размерам гормона, способному взаимодействовать как напрямую, например, непосредственно связывая и нейтрализуя реактивные формы кислорода и азота, так и опосредованно,

через вторичные механизмы, включая регуляцию других гормонов, антиоксидантную защиту и изменение активности генов. Однако особый интерес вызывает его взаимодействие с многочисленными вне- и внутриклеточными молекулярными мишенями, аффинность связывания с которыми варьируется в широком диапазоне концентраций — от пМ до мМ [7, 15]. Исследования последних десятилетий идентифицировали около двух десятков различных белковых мишеней мелатонина, охватывающих широкий спектр функциональных категорий, начиная от рецепторов, ферментов, ионных каналов, транспортных и структурных белков до сигнальных адаптеров [12]. И если рецепторно-опосредованные взаимодействия мелатонина являются наиболее охарактеризованными, то изучение неканонических мишеней гормона находится на стадии активного исследования. В данной статье рассматриваются механизмы связывания мелатонина с его мишенями, сигнальные пути и их влияние на физиологию и патологию.

Материалы и методы

Проведен поиск доступных полнотекстовых статей и обзоров на русском и английском языках, посвященных механизмам взаимодействия мелатонина с вне- и внутриклеточными белками, а также функциям гормона, опосредованным данными мишенями. Поиск осуществлялся в отечественных базах данных (ELibrary.ru, CyberLeninka.ru) и зарубежных (PubMed, ResearchGate) с использованием соответствующих ключевых слов.

Результаты и обсуждение

Основные физиологические эффекты мелатонина реализуются через взаимодействие с высокоаффинными (0,1-1 нМ) мембранными G-белок-сопряженными рецепторами (GPCR) MT1 и MT2 [7, 15], которые широко экспрессируются в центральной нервной системе и в периферических тканях. Оба рецептора имеют общий структурный мотив, состоящий из семи трансмембранных α -спиральных сегментов, формирующих гидрофобный карман для связывания лиганда. Активация мелатонином MT1 и MT2 запускает различные внутриклеточные сигнальные пути, основными из которых являются ингибирование цАМФ, протеинкиназы А, транскрипционного фактора CREB через Gi/o-белки и активация фосфолипазы С, протеинкиназы С, киназ MAPK/ERK и кальций-зависимых путей через Gq-белки. Ингибирующие эффекты мелатонина через MT1/MT2-рецепторы играют ключевую роль в регуляции сна, циркадных ритмов, сна, вазоконстрикции, иммунитета, ангиогенеза,

энергетического метаболизма и клеточного гомеостаза, стимулирующие же эффекты, опосредованные преимущественно через MT2-рецепторы, важны для иммунитета, нейропротекции и метаболической регуляции [7, 15].

Ядерные рецепторы RZR/ROR (транскрипционные факторы, принадлежащие к семейству связанных с ретиноевой кислотой орфанных рецепторов), экспрессируются в различных тканях, включая мозг, печень, иммунные клетки и другие органы, и обладают сродством к мелатонину на 2-3 порядка меньшим, чем MT1/MT2. За присоединение лиганда к рецептору отвечает С-концевой домен. RZR/ROR α связывается со специфическими последовательностями ДНК — ROR-элементы (ROREs) в промоторных областях генов-мишеней и модулирует транскрипцию генов, участвующих в иммунитете, пролиферации и метаболизме, но делает это менее специфично, чем через мембранные рецепторы [7, 15].

Напрямую связывать мелатонин могут некоторые ферменты, однако между этими белками и их предполагаемыми сайтами связывания нет никакого очевидного сходства, а концентрации мелатонина, необходимые для связывания, сильно различаются.

Хинонредуктаза-2 (QR2, NQO2) — фермент детоксикации, принадлежит к семейству NAD(P)H-зависимых редуктаз, участвующих в профилактике окислительного стресса путем ингибирования реакций переноса электронов хинонов. Иногда его обозначают как рецептор MT3, третий сайт с низким сродством связывания мелатонина на мембране, не являющийся классическим мембранным или ядерным рецептором. Может присутствовать и в качестве растворимого фермента. Экспрессируется в печени, почках, сердце, легких, кишечнике, мышцах и бурой жировой ткани. QR2 представляет собой симметричный димер с двумя карманами связывания мелатонина (в низком диапазоне мкМ) на границе двух мономеров QR2. Мелатонин связывается с активным центром NQO2, конкурируя с кофактором NADH и субстратами (например, токсичными хинонами), уменьшая тем самым окислительное повреждение ДНК, липидов и белков, что особенно важно в нейронах и клетках с высокой метаболической активностью. Регулируя редокс-баланс через этот фермент, мелатонин может ингибировать пролиферацию раковых клеток [5, 7].

Фермент металлопротеиназа-9 (MMP-9) — член семейства цинк-зависимых матричных металлопротеиназ, связанный с разрушением внеклеточного матрикса и его основных компонентов, играет ведущую роль в эмбриогенезе, восстановлении тканей после повреждения

при воспалении и ангиогенезе, обычно используется как маркер злокачественного фенотипа опухолей. Мелатонин в физиологических условиях связывается с ключевыми остатками каталитического сайта ММР-9, включая три цинк-координирующих гистидина, негативно регулирует ее экспрессию, снижая тем самым деградацию внеклеточного матрикса и инфильтрацию иммунных клеток (например, при артрите или атеросклерозе), ограничивает инвазию и миграцию опухолевых клеток [14].

Фосфопротеинфосфатаза 2A (PP2A) — незаменимая серин/треонин-фосфатаза, которая играет важную роль в развитии клеток, пролиферации и апоптозе, подвижности клеток, динамике цитоскелета и контроле клеточного цикла, а также в регуляции многочисленных сигнальных путей. PP2A также считается важным супрессором опухолей при некоторых типах рака. Выявлен потенциальный сайт связывания мелатонина в комплексе с производными грамина вблизи активного центра PP2A, что может влиять на его каталитическую активность. Мелатонин, связываясь (в наномолярном диапазоне) с каталитической субъединицей фермента, усиливает активность PP2A через подавление фосфорилирования ее ингибиторов (например, SET/I2PP2A) и дефосфорилирование мишеней, таких как киназы АКТ, ERK, GSK-3 β и стабилизирующий микротрубочки тау-белок, участвуя, таким образом, в поддержании клеточного гомеостаза и терапии нейродегенеративных, онкологических и сердечно-сосудистых заболеваний [2, 12].

Пепсин — протеаза, которая высвобождается в желудке для катаболизма потребленных белков в пептиды. Активный сайт связывания пепсина расположен в щели между N- и C-концевым доменом с двумя остатками аспартата, Asp32 и Asp215, которые важны для его ферментативной активности. Мелатонин (в микромолярных концентрациях) взаимодействует с каталитическим сайтом пепсина, причем Asp32 является частью предполагаемого связывающего кармана. Мелатонин может опосредованно контролировать активность пепсина через изменение pH (подавляет секрецию соляной кислоты париетальными клетками желудка, что уменьшает активацию пепсиногена в пепсин) и защиту слизистой (ограничивает контакт пепсина с эпителием через стимуляцию синтеза слизи), что важно в терапии желудочно-кишечных патологий [11].

Транспортные белки помогают транспортировать молекулы через мембранные барьеры пассивно или активно (против градиента концентрации с затратой энергии). И в транспортировке мелатонина через плазму и митохондриальные мембраны участвуют некоторые белки.

Показано, что в высоких концентрациях (мМ) мелатонин может связываться с транспортером глюкозы-1 (GLUT1) в том же месте, что и глюкоза. Мелатонин ингибирует GLUT1 в опухолях, замедляя их рост за счет конкуренции с глюкозой, но поддерживает функцию транспортера в физиологических условиях, например, обеспечивая баланс нейронов за счет модуляции фермента в гематоэнцефалическом барьере, что подчеркивает двойную роль гормона в регуляции энергетического метаболизма и терапии заболеваний. Кроме того, присутствие GLUT1 в митохондриальных мембранах может быть ответственным за присутствие мелатонина в митохондриях [8].

Олигопептидные транспортеры PEPT1 и PEPT2 (PEPT1/2) играют ключевую роль в транспорте ди- и трипептидов, пептидоподобных молекул через клеточные мембраны в кишечнике, почках, легких и мозге (транспорт нейропептидов), а также участвуют в поглощении мелатонина клетками и в усвоении некоторых лекарственных препаратов. Взаимодействие мелатонина с ключевыми аминокислотными остатками в связывающем домене исследуемых транспортеров наблюдается в микромолярном и миллимолярном диапазонах концентраций. При этом стабильность у комплекса мелатонина-PEPT1 выше, что обусловлено более сильной водородной связью, гидрофобной силой и электростатическим притяжением. Это ведет к усилению экспрессии PEPT1 в кишечнике, улучшению всасывания пептидов, влиянию на суточные колебания активности PEPT1/2. Функциональные исследования показали, что PEPT1/2 способствуют активной транспортировке мелатонина в митохондриях, оказанию онкостатического действия на злокачественные клетки [9].

К другим целевым белкам мелатонина относятся и сывороточный альбумин — основной транспортный белок крови, связывающий множество низкомолекулярных соединений, включая гормоны, лекарства и метаболиты. Мелатонин преимущественно связывается с Site I (субдомен IIA) альбумина в микромолярных концентрациях. Белок действует как резервуар, регулируя свободную (активную) фракцию мелатонина и замедляя его выведение [10].

Канал транзитного рецепторного потенциала ваниллоидного фактора 1 (TRPV1) — белок семейства ионных каналов транзитного рецепторного потенциала. Мелатонин модулирует активность TRPV1, преимущественно выступая аллостерическим ингибитором этого ионного канала, связываясь в кармане трансмембранного домена, где индольное кольцо мелатонина формирует гидрофобные и π -стэкинг-взаимодействия

с остатками Tyr511 и Phe591, тогда как амидная группа участвует в водородных связях с Ser512 и Thr550. Ингибирующий эффект потенцируется при физиологических концентрациях (0,1–1 нМ), что предполагает роль эндогенного мелатонина в регуляции болевой чувствительности через TRPV1-зависимые механизмы [6].

Митохондриальная пора переходной проницаемости (mtPTP) — многобелковый комплекс, высокопроводимый канал во внутренней мембране митохондрий. В условиях окислительного стресса, высокого уровня Ca^{2+} и низкого уровня АТФ, ряд белков, включая Bax и Bad, привлекаются и обеспечивают образование пор в состоянии высокой проводимости, что приводит к нарушению ионного баланса митохондрий (высвобождению Ca^{2+} в цитозоль, выбросу цитохрома и других проапоптотических факторов, нарушению синтеза АТФ). Регистрация токов каналов mtPTP из участков внутренней митохондриальной мембраны показала зависимое от концентрации ингибирование токов mtPTP мелатонином (микромольные концентрации). Помимо антиоксидантного, прямое воздействие мелатонина на компоненты комплекса mtPTP ведет к подавлению активности циклофилина D (регулятор поры), к стабилизации структуры мембраны за счет уменьшения чувствительности к Ca^{2+} . Этот эффект может способствовать антиапоптотическому действию мелатонина, в частности и при нейродегенеративных заболеваниях [1].

Помимо прочего, мелатонин связывается с белками-акцепторами кальция: кальмодулином (CaM), протеинкиназой С (PKC) и кальретикулином. Эти три белка участвуют в передаче кальциевого сигнала, а также в регуляции концентрации кальция внутри клетки.

Кальмодулин (CaM) — филогенетически консервативный белок, который является основным трансдуктором кальциевой сигнализации. Мелатонин может модулировать активность CaM как через регуляцию Ca^{2+} и окислительного стресса, так и напрямую, через один из гидрофобных связывающих карманов CaM, который экспонируется на поверхности белка при конформационных изменениях, вызванных Ca^{2+} . Мелатонин связывается с кальмодулином (микро-, миллимольные концентрации), конкурируя с кальцием за сайты связывания, подавляя активацию кальмодулин-зависимых ферментов, таких как кальций / кальмодулин-зависимая протеинкиназа II (CaMKII), фосфодиэстераза, нейрональная синтаза оксида азота, оказывая, нейро-, кардиопротективное, противовоспалительное действие, снижая продукцию оксида азота, влияя на уровень цАМФ. Но в зависимости от окружения (водного или липидного) гормон может

стимулировать активность целевых белков Ca^{2+} -CaM, вызывая увеличение цитозольных относительных количеств этих белков в определенных субклеточных компартментах. Также мелатонин может принимать участие в стабилизации микротрубочек: при наномольных концентрациях цитоскелетные эффекты мелатонина могут быть опосредованы комплексом Ca^{2+} -CaM, в то время как при более высоких концентрациях (10 мкМ) происходит «неспецифическое» связывание мелатонина с тубулином (основным белком микротрубочек) [3].

Кальретикулин — высококонсервативный белок, расположенный в эндоплазматическом ретикулуме, играет важную роль в модуляции различных клеточных процессов (активность шаперона, контроль внутриклеточного гомеостаза Ca^{2+} и регуляция клеточной адгезии путем взаимодействия с интегринами в цитоплазматическом участке плазматической мембраны). Высокоаффинное связывание мелатонина ($K_d = 1$ нМ) зависело от Ca^{2+} и не конкурировало с NAS, 4P-PDOT или лузиндолом, тремя лигандами рецептора мелатонина, связанными с G-белком. Мелатонин связывает как кальмодулин, так и кальретикулин только в присутствии Ca^{2+} , регулируя таким образом кальциевый гомеостаз [13].

Протеинкиназа С (PKC) — фермент семейства серин / треониновых киназ, активируемых кальцием (Ca^{2+}), диацилглицерином (DAG) и другими липидными вторичными мессенджерами, осуществляющий фосфорилирование белков и участвующий в сигнальных каскадах клеток. Предполагают, что мелатонин может напрямую связываться с изоформами PKC, модулируя ее активность [4].

Выводы

Таким образом, мелатонин демонстрирует плеiotропную активность, взаимодействуя с широким спектром молекулярных мишеней, включая как специфические рецепторы, так и многочисленные неспецифические белки с разной аффинностью и разными сигнальными механизмами. При оценке фармакодинамических эффектов гормона в различных физиологических и патофизиологических процессах необходимо учитывать его локальную концентрацию, пространственное распределение в клеточных компартментах и экспрессионный профиль самих мишеней в ткани.

Список литературы / References

1. Andrabi S.A., Sayeed I., Siemen D., Wolf G., Horn T.F. Direct inhibition of the mitochondrial permeability transition pore: a possible mechanism responsible for anti-apoptotic effects of melatonin. *FASEB J.*, 2004, Vol. 18, no. 7, pp. 869-871.
2. Arribas R.L., Romero A., Egea J., de Los Rios C. Modulation of serine/threonine phosphatases by melatonin: therapeutic approaches in neurodegenerative diseases. *Br. J. Pharmacol.*, 2018, Vol. 175, no. 16, pp. 3220-3229.
3. Benitez-King G., Argueta J., Miranda-Riestra A., Munoz-Delgado J., Estrada-Reyes R. Interaction of the Melatonin/ Ca^{2+} -CaM complex with calmodulin kinase II: physiological importance. *Mol. Pharmacol.*, 2024, Vol. 106, no. 1, pp. 3-12.
4. Benitez-King G., Hernandez M.E., Tovar R., Ramirez G. Melatonin activates PKC-alpha but not PKC-epsilon in N1E-115 cells. *Neurochem. Int.*, 2001, Vol. 39, no. 2, pp. 95-102.
5. Boutin J.A., Ferry G. Is MT3 Is Quinone Reductase 2? *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 2019, Vol. 368, no. 1, pp. 59-65.
6. Chen Y., Wu X., Yang X., Liu X., Zeng Y., Li J. Melatonin antagonizes ozone-exacerbated asthma by inhibiting the TRPV1 channel and stabilizing the Nrf2 pathway. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.*, 2021, Vol. 28, no. 42, pp. 59858-59867.
7. Dubocovich M.L., Delagrange P., Krause D.N., Sugden D., Cardinali D.P., Olcese J. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXV. Nomenclature, Classification, and Pharmacology of G Protein-Coupled Melatonin Receptors. *Pharm. Rev.*, 2010, Vol. 62, pp. 343-380.
8. Hevia D., Gonzalez-Menendez P., Quiros-Gonzalez I., Miar A., Rodriguez-Garcia A., Tan D.X., Reiter R.J., Mayo J.C., Sainz R.M. Melatonin uptake through glucose transporters: a new target for melatonin inhibition of cancer. *J. Pineal. Res.*, 2015, Vol. 58, no. 2, pp. 234-250.
9. Huo X., Wang C., Yu Z., Peng Y., Wang S., Feng S., Zhang S., Tian X., Sun C., Liu K., Deng S., Ma X. Human transporters, PEPT1/2, facilitate melatonin transportation into mitochondria of cancer cells: An implication of the therapeutic potential. *J. Pineal. Res.*, 2017, Vol. 62, no. 4, e12390. <https://doi.org/10.1111/jpi.12390>.
10. Li X., Wang S. Binding of glutathione and melatonin to human serum albumin: a comparative study. *Colloids Surf. B Biointerfaces*, 2015, Vol. 125, pp. 96-103.
11. Li X., Ni T. Binding of glutathione and melatonin to pepsin occurs via different binding mechanisms. *Eur. Biophys. J.*, 2016, Vol. 45, no. 2, pp. 165-174.
12. Liu L., Labani N., Cecon E., Jockers R. Melatonin Target Proteins: Too Many or Not Enough? *Front. Endocrinol. (Lausanne)*, 2019, Vol. 10, 791. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00791>.
13. Macias M., Escames G., Leon J., Coto A., Sbihi Y., Osuna A., Acuna-Castroviejo D. Calreticulin-melatonin. An unexpected relationship. *Eur. J. Biochem.*, 2003, Vol. 270, no. 5, pp. 832-840.
14. Rudra D.S., Pal U., Maiti N.C., Reiter R.J., Swarnakar S. Melatonin inhibits matrix metalloproteinase-9 activity by binding to its active site. *J. Pineal. Res.*, 2013, Vol. 54, no. 4, pp. 398-405.
15. Slominski R.M., Reiter R.J., Schlambitz-Loutsevitch N., Ostrom R.S., Slominski A.T. Melatonin membrane receptors in peripheral tissues: distribution and functions. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 2012, Vol. 351, no. 2, pp. 152-166.

Автор:

Глебедина Н.С. — к.б.н., 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:

Glebezina N.S., PhD (Biology), Researcher, Laboratory of Immunoregulation, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Perm Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation

Поступила 19.03.2025
Принята к печати 25.05.2025

Received 19.03.2025
Accepted 25.05.2025

МЕЛАТОНИНОВЫЕ РЕЦЕПТОРЫ MT1/MT2 В ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ Т-ХЕЛПЕРНЫХ ПОПУЛЯЦИЯХ

Куклина Е.М.¹, Данченко И.Ю.², Байдина Т.В.²

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

² ФГБОУ ВО «Пермский государственный медицинский университет имени академика Е.А. Вагнера» Министерства здравоохранения РФ, г. Пермь, Россия

Резюме. Эпифизарный гормон мелатонин является эффективным регулятором основных Т-хелперных популяций Th1 и Th17. В настоящее время фокус внимания в исследовании Т-хелперов смещается с классических на неклассические варианты этих клеток, в первую очередь — на Th1-поляризованные лимфоциты Th17 (Th17.1), которые формируются *in vitro* и *in vivo* путем трансформации дифференцированных клеток Th17 в Th1 в поляризующих условиях. Клетки Th17.1 обладают существенно более высоким провоспалительным потенциалом в сравнении с классическими Th1/Th17 и играют ключевую роль в патогенезе Th-зависимых провоспалительных заболеваний, включая и аутоиммунные. Такой сдвиг приоритетов в исследовании Т-хелперной активности поднимает вопрос о чувствительности неклассических патогенных CD4⁺Т-лимфоцитов к мелатонин-зависимой регуляции, которая в значительной степени определяется экспрессией на мембране клеток высокоаффинных рецепторов для гормона, MT1 и MT2. В настоящей работе исследована экспрессия MT1 и MT2 провоспалительными Т-хелперными популяциями периферической крови. Показано, что неклассические Th1-поляризованные клетки Th17 имеют избирательно высокий уровень экспрессии этих рецепторов, что делает их приоритетной мишенью для действия мелатонина. Важно отметить, что MT1 и MT2 реализуют свои эффекты главным образом через ингибиторные G-белки (Gi), подавляя активность аденилатциклазы, и, в меньшей степени, через белки Gq и Go, активируя фосфолипазу С, кальциевые каналы и митоген-активируемые протеинкиназы. При этом все перечисленные сигнальные пути, запускаемые при связывании мелатонина с мембранными мелатониновыми рецепторами, являются для Т-клеток стимулирующими или костимулирующими. В связи с этим, логично ожидать стимулирующего действия мелатонина в отношении патогенной популяции Th17.1. Тем не менее мелатонин имеет не только мембранные, но и ядерный рецептор, RORα (облигатная молекула для клеток Th17 — как классических, так и неклассических), а в микромолярных концентрациях спо-

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 (342) 280-84-31.
Факс: 8 (342) 280-92-11.
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 (342) 280-84-31.
Fax: +7 (342) 280-92-11.
E-mail: ibis_07@mail.ru

Образец цитирования:

Е.М. Куклина, И.Ю. Данченко, Т.В. Байдина
«Мелатониновые рецепторы
MT1/MT2 в провоспалительных Т-хелперных
популяциях» // Российский иммунологический журнал,
2025. Т. 28, № 3. С. 375–380.
doi: 10.46235/1028-7221-17120-MMM
© Куклина Е.М. и соавт., 2025
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

E.M. Kuklina, I.Yu. Danchenko, T.V. Baidina “MT1/
MT2 melatonin receptors in proinflammatory T helper cell
populations”, Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy
Immunologicheskii Zhurnal, 2025, Vol. 28, no. 3, pp. 375–380.
doi: 10.46235/1028-7221-17120-MMM
© Kuklina E.M. et al., 2025
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.46235/1028-7221-17120-MMM

способен связываться с дополнительными внутриклеточными мишенями, такими как кальмодулин или гидрохинон, и запускать другие сигнальные механизмы, которые могут корректировать MT1/MT2-зависимые сигналы.

Ключевые слова: мелатонин, MT1, MT2, Th17, Th1, Th17.1

MT1/MT2 MELATONIN RECEPTORS IN PROINFLAMMATORY T HELPER CELL POPULATIONS

Kuklina E.M.^a, Danchenko I.Yu.^b, Baidina T.V.^b

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

^b Perm State Medical University named after E.A. Wagner of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Perm, Russian Federation

Abstract. Melatonin, a pineal gland hormone, is an effective regulator of the main T helper Th1 and Th17 populations. Currently, the studies of T helpers are shifting from classical to non-classical variants of these cells, primarily to Th1-polarized Th17 lymphocytes (Th17.1), which are formed *in vitro* and *in vivo* by transformation of differentiated Th17 cells into Th1 under polarizing conditions. Th17.1 cells have a significantly higher pro-inflammatory potential compared to classical Th1/Th17 and play a key role in pathogenesis of Th-dependent pro-inflammatory disorders, including autoimmune diseases. Such a shift in priorities in the study of T helper activity raises the issue of sensitivity of non-classical pathogenic CD4⁺T lymphocytes to melatonin-dependent regulation, which is largely determined by the cell membrane expression of high-affinity MT1 and MT2 melatonin receptors. **Materials and methods.** In this work, we studied the expression of MT1 and MT2 at the proinflammatory T helper populations in peripheral blood. **Results.** It was shown that non-classical Th1-polarized Th17 cells have a selectively high level of expression of these receptors, thus making them a priority target for the action of melatonin. **Discussion and conclusions.** Worth of note, MT1 and MT2 exert their effects, mainly, *via* inhibitory G proteins (Gi), suppressing the activity of adenylate cyclase, and, to a lesser extent, through Gq and Go proteins, activating phospholipase C, calcium channels and mitogen-activated protein kinases. Moreover, all these signaling pathways triggered by melatonin binding to specific membrane receptors are stimulatory or co-stimulatory for T cells. In this regard, one could expect a stimulatory effect of melatonin on the pathogenic Th17.1 population. However, melatonin receptors are not only on membrane, but also in target cell unclear. E.g., ROR α (an obligate molecule for Th17 cells, both classical and non-classical) is able to bind at micromolar amounts to additional intracellular targets, such as calmodulin or hydroquinone, and trigger other signaling mechanisms that may correct MT1/MT2-dependent signals.

Keywords: melatonin, MT1, MT2, Th17, Th1, Th17.1

Работа выполнена при поддержке гранта РФФ № 24-25-00331.

Введение

Помимо функции главного циркадного регулятора в организме, гормону эпифиза мелатонину отводят важную роль в контроле ключевых клеточных процессов, таких как пролиферация, дифференцировка или апоптоз, в том числе — в клетках иммунной системы. Еще в первых работах по мелатонину была убедительно показана способность гормона регулировать активность классической провоспалительной Т-хелперной популяции Th1 [2, 8], а на более позднем этапе

эффекты мелатонина были выявлены и в отношении второй основной провоспалительной популяции, Th17 [1, 7]. В настоящее время фокус внимания в исследовании Т-хелперов смещается с классических на неклассические варианты этих клеток, в первую очередь — на Th1-поляризованные лимфоциты Th17 (Th17.1, продукт трансформации зрелых Th17 в Th1 в поляризующих условиях *in vitro* и *in vivo*). Клетки Th17.1 обладают существенно более высоким провоспалительным потенциалом в сравнении с классическими Th1/Th17 [14, 15] и играют ключевую роль в патогенезе Th-зависимых провоспалительных заболеваний, включая и аутоиммунные [12, 13]. Такой сдвиг приоритетов в

исследовании Т-хелперной активности поднимает вопрос о чувствительности неклассических патогенных CD4⁺Т-лимфоцитов к мелатонин-зависимой регуляции, которая в значительной степени определяется экспрессией на мембране клеток высокоаффинных рецепторов для гормона, MT1 и MT2 [6, 11]. Решение этого вопроса является предметом настоящего исследования.

Материалы и методы

В работе использовали лейкоциты здоровых доноров (средний возраст 37,0±2,69 года). От всех доноров получено информированное согласие на участие в исследовании, которое было одобрено Комитетом по этике «ИЭГМ УрО РАН» и проведено в соответствии с положениями Хельсинкской декларации об исследованиях с участием человека. Лейкоциты выделяли из гепаринизированной венозной крови центрифугированием в градиенте плотности фиколла-верографина (1,077 г/см³). Для экспериментов *in vitro* из суспензии мононуклеарных клеток получали наивные CD4⁺Т-лимфоциты, фракционированием на иммуномагнитных частицах с помощью стандартных коммерческих систем для выделения. Наивные CD4⁺Т-лимфоциты культивировали в присутствии поликлонального активатора (анти-CD3/CD28) в поляризующих условиях (IL-6/IL-1/IL-23) в течение 3-5 суток. В суспензии мононуклеарных лейкоцитов и в дифференцированных *in vitro* CD4⁺Т-лимфоцитов на основе экспрессии мембранных маркеров определяли классические Т-хелперные популяции Th17 (CD4⁺CCR6⁺CCR4⁺CXCR3⁺Т-клетки) и Th1 (CD4⁺CCR6⁺CXCR3⁺Т-клетки), а также Th1-поляризованные лимфоциты Th17, коэкспрессирующие маркеры обеих классических популяций, Th17/Th1, (CD4⁺CCR6⁺CCR4⁺CXCR3⁺Т-клетки), так называемые клетки Th17.1. Идентификация Т-хелперных популяций проводилась проточной цитометрией, с использованием соответствующих коммерческих моноклональных антител. В суспензии мононуклеарных лейкоцитов клетки Th17/Th1/Th17.1 определялись отдельно во фракции Т-клеток памяти/эффекторных Т-лимфоцитов (CD4⁺CD45R0⁺). Экспрессия мембранных мелатониновых рецепторов MT1/MT2 оценивалась во всех перечисленных Т-хелперных популяциях также проточной цитометрией. Статистический анализ проводили с использованием парного t-критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение

В исследовании экспрессии мембранных мелатониновых рецепторов Т-лимфоцитами *ex vivo* показан существенно более высокий уровень MT1 в популяции CD4⁺Т-клеток памяти/эффекторных

Т-лимфоцитов в сравнении с общей Т-хелперной популяцией (процент MT1⁺Т-клеток: 4,45±1,00 в популяции CD4⁺Т-лимфоцитов и 37,3±8,43 в популяции CD4⁺CD45R0⁺Т-клеток; $p < 0,05$). Более детальный анализ этого рецептора в различных Т-хелперных субпопуляциях выявил следующие закономерности: экспрессия MT1 лимфоцитами Th1 была вдвое выше таковой для Th17 (процент MT1⁺Т-клеток: 29,2±7,89 в популяции Th1 (CD4⁺CCR6⁺CXCR3⁺Т-клеток) и 15,5±4,71 для клеток Th17 (CD4⁺CCR6⁺CCR4⁺CXCR3⁺Т-клеток); $p < 0,05$), а в неклассической Т-хелперной популяции Th1-поляризованных лимфоцитов Th17 уровень MT1 был статистически значимо выше аналогичных показателей в обеих классических популяциях, Th1 и Th17 (процент MT1⁺Т-клеток: 52,5±11,8 в популяции Th17.1 (CD4⁺CCR6⁺CCR4⁺CXCR3⁺Т-клеток) и 29,2±7,89 в популяции Th1 (CD4⁺CCR6⁺CXCR3⁺Т-клеток); $p < 0,05$; или 15,5±4,71 для клеток Th17 (CD4⁺CCR6⁺CCR4⁺CXCR3⁺Т-клеток); $p < 0,05$). Экспрессия второго мелатонинового рецептора MT2 в общей популяции CD4⁺Т-лимфоцитов была существенно ниже таковой для MT1, хотя статистической значимости для этого отличия не выявлено (процент CD4⁺MT⁺Т-клеток: 4,45±1,00 для MT1 и 0,963±0,012 для MT2; $p > 0,05$). В экспериментах *in vitro* на Т-хелперах, дифференцированных из наивных CD4⁺Т-лимфоцитов в поляризующих условиях, были получены сходные результаты: хотя экспрессия MT1 была сопоставима для классических популяций Th1 и Th17 (процент MT1⁺Т-клеток: 37,4±9,51 и 32,9±8,60 соответственно), уровень данного рецептора у неклассических Th1-поляризованных клеток Th17 существенно превышал эти показатели (процент MT1⁺Т-клеток: 60,8±12,7 в популяции Th17.1 (CD4⁺CCR6⁺CCR4⁺CXCR3⁺Т-клеток) и 37,4±9,51 в популяции Th1 (CD4⁺CCR6⁺CXCR3⁺Т-клеток); $p < 0,05$; или 32,9±8,60 для клеток Th17 (CD4⁺CCR6⁺CCR4⁺CXCR3⁺Т-клеток); $p < 0,05$). В целом, проведенные исследования показали, что высокоаффинные рецепторы для мелатонина MT1/MT2 конститутивно присутствуют на мембране CD4⁺Т-лимфоцитов и существенно усиливают экспрессию в ответ на стимуляцию клеток. При этом уровень MT1 существенно выше, чем MT2, а его распределение в Т-хелперной популяции неравномерно — неклассические Th1-поляризованные клетки Th17 имеют избирательно высокий уровень экспрессии этого рецептора, что делает их приоритетной мишенью для действия мелатонина.

Прогнозирование MT1/MT2-зависимых эффектов мелатонина требует анализа внутриклеточных сигнальных механизмов, реализуемых при связывании гормона — большинство этих

данных получено на неиммунных клетках, однако есть единичные работы, демонстрирующие такие эффекты непосредственно в Т-лимфоцитах. Мембранные рецепторы для мелатонина MT1 и MT2 представляют собой типичные G-белок-связывающие рецепторы, состоящие из семи трансмембранных α -спиральных сегментов, соединенных чередующимися внутриклеточными и внеклеточными петлями, с внеклеточным аминоконцом и внутриклеточным карбоксильным. Они включают 350 и 362 аминокислот соответственно и имеют 55%-ную гомологию общей последовательности и 70%-ную в трансмембранном домене [6, 11]. MT1 и MT2 различаются по своей аффинности к мелатонину: у человека константы ингибирования составляют 80,7 pM для первого рецептора и 383 pM для второго.

При связывании лиганда MT1 и MT2 инициируют сходные внутриклеточные сигналы, главным образом через ингибиторные G-белки, чувствительные к коклюшному токсину (Gi-белки, изоформы G α i2 и G α i3), подавляя активность аденилатциклазы, хотя они также могут передавать сигнал через белки Gq/11, G α o и G16, участвуя таким образом в регуляции фосфолипазы C, кальциевых каналов и митоген-активируемых протеинкиназ (МАРК) [3, 11]. Сигнальный путь, реализуемый через Gi-белки и связанный с ингибированием аденилатциклазы, сопровождается последовательным снижением уровня сАМР, активности сАМР-индуцируемой протеинкиназы А (РКА) и РКА-зависимого фосфорилирования ядерного фактора CREB (сАМР-responsive element). Фосфорилированный CREB далее связывается с промоторами различных генов и регулирует их транскрипцию. Именно Gi/сАМР-зависимый путь является ключевым в регуляции экспрессии «часовых генов» в центральной нервной системе и периферических тканях [11]. Связывание активированных МТ с белками Gq ведет к стимуляции фосфолипазы C (PLC), которая превращает фосфатидилинозитол (PIP2) в диацилглицерин (DAG) и инозитол 1,4,5-трифосфат (IP3), а последние, в свою очередь, вызывают активацию протеинкиназы C (PKC), вход кальция в клетку, а также стимуляцию МАРК, включая ERK, JNK и p38. И наконец, МТ-зависимую стимуляцию белков Gi/o связывают преимущественно с повышением активности киназ, регулируемых внеклеточным сигналом (ERK) [3, 11].

Следует отметить, что внутриклеточные сигналы, реализуемые при связывании мелатонина с мембранными рецепторами, напрямую зависят от клеточного контекста, т. е. от типа клеток, уровня их дифференцировки, активационного статуса, а также, в немалой степени, от рецепторного аппарата — речь идет о способности МТ1

и МТ2 формировать гомо- и гетеродимеры (как друг с другом, так и с сиротским рецептором GPR50), и изменение структуры может существенно скорректировать сигнализацию, вплоть до потери функции рецептора [3, 11]. Поэтому, говоря о потенциальных МТ1/МТ2-зависимых эффектах мелатонина в Т-лимфоцитах, следует учитывать все эти нюансы и опираться в первую очередь на данные, полученные для лимфоидных клеток. Тем не менее теоретически все перечисленные выше сигнальные пути, запускаемые при связывании мелатонина с мембранными рецепторами, являются для Т-клеток стимулирующими или костимулирующими: активация фосфолипазы C, с последующей стимуляцией РКС и кальциевых каналов является классическим активационным сигналом в Т-лимфоцитах в ответ на распознавание антигена или на поликлональную стимуляцию; МАР-киназный каскад лежит в основе классического костимулирующего сигнала, обязательного для адекватной активации лимфоцита (без него активированная клетка уйдет в апоптоз или анергию); снижение уровня сАМР в клетке также важный элемент активационного сигнала — сАМР-понижающие агенты служат традиционными усилителями антиген-зависимого активационного сигнала, тогда как сАМР-повышающие агенты, напротив, ингибируют его.

Эти выводы имеют экспериментальное подтверждение: в большинстве ранних работ по мелатонин-зависимой регуляции Т-клеточного звена показаны стимулирующие эффекты гормона. Так, выявлено сильное и дозозависимое снижение уровня сАМР в Т-лимфоцитах в ответ на действие мелатонина, и одновременный рост уровня диацилглицерина, свидетельствующий об активации фосфолипазы C в клетке [10]. Другими исследованиями показано, что мелатонин усиливает пролиферацию спленоцитов, с отменной эффективностью на фоне неселективной блокады МТ1/МТ2 [5], а также стимулирует продукцию Т-лимфоцитами главного аутокринного ростового фактора IL-2 и отменяет ингибирующее действие на этот процесс простагландина E2, причем эффект гормона реализуется через МТ1 и ассоциирован со снижением уровня сАМР в клетке [2]. Кроме того, гормон стимулирует дифференцировку клеток Th1 [9], увеличивает продукцию IFN γ мышинными спленоцитами [2] и циркулирующими CD4⁺Т-лимфоцитами человека [8], усиливает дифференцировку клеток Th17 *in vitro* [1]. В то же время имеется немало работ, демонстрирующих обратные эффекты мелатонина, в частности подавление активности провоспалительных Т-хелперных популяций Th1 и Th17 [4, 7]. Противоречия в данных по эффектам гормона в отношении клеток Th1 и Th17 могут

быть связаны с упоминавшимся ранее клеточным контекстом, в том числе с особенностями состава/структуры мелатониновых рецепторов в данных клетках, но более вероятным является другое объяснение: практически во всех работах, демонстрирующих супрессивные (противовоспалительные) эффекты мелатонина, последний использовался в микромолярных концентрациях, а в этом случае гормон может связываться с дополнительными внутриклеточными мишенями, такими как кальмодулин или гидрохинон, и запускать другие сигнальные механизмы, которые, возможно, перекрывают MT1/MT2-зависимые сигналы.

Выводы

Популяция Th17 обладает высокой пластичностью: рестимуляция этих лимфоцитов в воспалительном окружении способна индуцировать их трансформацию в клетки с другим фенотипом, и наиболее часто реализуется сдвиг в направлении Th1. Результатом такой трансформации является появление клеток, сочетающих фенотипические характеристики обеих популяций и экспрессирующих наряду с классическими маркерами клеток Th17, такими как транскрипционный фактор RORC, мембранные маркеры CD161/CCR6 и цитокины IL-17A/IL-17F, ключевые Th1-ассоциированные молекулы — транскрипционный фактор T-bet, хемокиновый рецептор CXCR3 и важнейший Th1-цитокин IFN γ [14]. Данная популяция имеет уникальные функциональные свойства — повышенный про-

воспалительный потенциал и способность преодолевать гистогематические барьеры [14, 15]. В норме IFN γ -продуцирующие Th17 присутствуют в периферической крови в следовых количествах, однако их содержание в инфильтратах воспаленных тканей достигает 60% [13], и именно этим клеткам в настоящее время отводится ключевая роль в патогенезе многих воспалительных заболеваний, включая и аутоиммунные [12, 13], причем для многих патологий убедительно показана прямая ассоциация с данной неклассической Т-хелперной популяцией. Как следствие, процесс трансдифференцировки Th17 в Th1 рассматривается в настоящее время как перспективная терапевтическая мишень.

Подведем итоги. С одной стороны, мы показали, что неклассические Th1-поляризованные клетки Th17 имеют повышенную экспрессию высокоаффинного мембранного рецептора MT1, что указывает на их потенциальную избирательную чувствительность к действию мелатонина. С другой стороны, анализ сигнальной трансдукции, реализуемой через MT1 как в иммунных, так и в неиммунных клетках, позволяет прогнозировать стимулирующее действие гормона на эту клеточную популяцию. Учитывая, что неклассические Т-хелперы Th17.1 за счет повышенной провоспалительной и миграционной активности играет ключевую роль в патогенезе Th-зависимых воспалительных заболеваний, в первую очередь — аутоиммунных, фармакологическое применение мелатонина при таких патологиях требует тщательной оценки риска возможных обострений.

Список литературы / References

1. Куклина Е.М., Глебздина Н.С., Некрасова И.В. Роль мелатонина в контроле дифференцировки Т-лимфоцитов, продуцирующих интерлейкин-17 (Th17) // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, 2015. Т. 160, № 11. С. 604-607. [Kuklina E.M., Glebezina N.S., Nekrasova I.V. Role of Melatonin in the Regulation of Differentiation of T Cells Producing Interleukin-17 (Th17). *Byulleten eksperimentalnoy biologii i meditsiny* = *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2016, Vol. 160, no. 5, pp. 656-658. (In Russ.)]
2. Carrillo-Vico A., Garcia-Maurino S., Calvo J.R., Guerrero J.M. Melatonin counteracts the inhibitory effect of PGE2 on IL-2 production in human lymphocytes via its Mt1 membrane receptor. *FASEB J.*, 2003, Vol. 17, pp. 755-757.
3. Cecon E., Oishi A., Jockers R. Melatonin receptors: molecular pharmacology and signalling in the context of system bias. *Br. J. Pharm.*, 2018, Vol. 175, pp. 3263-3280.
4. Chang T., Niu C., Sun C., Ma Y., Guo R., Ruan Z., Gao Y., Lu X., Li H., Lin Y., Lin J., Li Z. Melatonin exerts immunoregulatory effects by balancing peripheral effector and regulatory T helper cells in myasthenia gravis. *Aging (Albany NY)*, 2020, Vol. 12, no. 21, pp. 21147-21160.
5. Drazen D.L., Bilu D., Bilbo S.D., Nelson R.J. Melatonin enhancement of splenocyte proliferation is attenuated by luzindole, a melatonin receptor antagonist. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 2001, Vol. 280, pp. R1476-R1482.
6. Dubocovich M.L., Delagrange P., Krause D.N., Sugden D., Cardinali D.P., Olcese J. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXV. Nomenclature, classification, and pharmacology of G protein-coupled melatonin receptors. *Pharm. Rev.*, 2010, Vol. 62, pp. 343-380.
7. Farez M.F., Mascanfroni I.D., Mendez-Huergo S.P., Yeste A., Murugaiyan G., Garo L.P., Balbuena Aguirre M.E., Patel B., Ysraelit M.C., Zhu C., Kuchroo V.K., Rabinovich G.A., Quintana F.J., Correale J. Melatonin Contributes to the Seasonality of Multiple Sclerosis Relapses. *Cell*, 2015, Vol. 162, no. 6, pp. 1338-1352.

8. Garcia-Maurino S., Gonzalez-Haba M.G., Calvo J.R., Rafii-El-Idrissi M., Sanchez-Margalet V., Goberna R., Guerrero J.M. Melatonin enhances IL-2, IL-6 and IFN γ production by human circulating CD4⁺ cells: A possible nuclear receptor-mediated mechanism involving T helper type 1 lymphocytes and monocytes. *J. Immunol.*, 1997, Vol. 159, no. 2, pp. 574-581.
9. Garcia-Maurino S., Pozo D., Carrillo-Vico A., Calvo J.R., Guerrero J.M. Melatonin activates Th1 lymphocytes by increasing IL-12 production. *Life Sci.*, 1999, Vol. 65, pp. 2143-2150.
10. Garcia-Perganeda A., Pozo D., Guerrero J.M., Calvo J.R. Signal transduction for melatonin in human lymphocytes: involvement of a pertussis toxin-sensitive G protein. *J. Immunol.*, 1997, Vol. 159, no. 8, pp. 3774-3781.
11. Nikolaev G., Robeva R., Konakchieva R. Membrane melatonin receptors activated cell signaling in physiology and disease. *Int. J. Mol. Sci.*, 2021, Vol. 23, no. 1, 471. doi: 10.3390/ijms23010471.
12. Quirant-Sanchez B., Presas-Rodriguez S., Mansilla M.J., Teniente-Serra A., Hervás-García J.V., Brieva L., Moral-Torres E., Cano A., Munteis E., Navarro-Barriuso J., Martínez-Caceres EM, Ramo-Tello C. Th1Th17CM lymphocyte subpopulation as a predictive biomarker of disease activity in multiple sclerosis patients under dimethyl fumarate or fingolimod treatment. *Mediators Inflamm.*, 2019, Vol. 2019, 8147803. doi: 10.1155/2019/8147803.
13. Ramstein J., Broos C.E., Simpson L.J., Ansel K.M., Sun S.A., Ho M.E., Woodruff P.G., Bhakta N.R., Christian L., Nguyen C.P., Antalek B.J., Benn B.S., Hendriks R.W., van den Blink B., Kool M., Koth L.L. IFN- γ -Producing T-Helper 17.1 Cells are increased in sarcoidosis and are more prevalent than T-helper type 1 cells. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.*, 2016, Vol. 193, no. 11, pp. 1281-1291.
14. Schnell A., Littman D.R., Kuchroo V.K. TH17 cell heterogeneity and its role in tissue inflammation. *Nat. Immunol.*, 2023, Vol. 24, pp. 19-29.
15. Thakore P.I., Schnell A., Zhao M., Huang L., Hou Y., Christian E., Zaghouni S., Wang C., Singh V., Ma S., Sankar V., Notarbartolo S., Buenrostro J.D., Sallusto F., Patsopoulos N.A., Rozenblatt-Rosen O., Kuchroo V.K., Regev A. The Chromatin landscape of Th17 cells reveals mechanisms of diversification of regulatory and pro-inflammatory states. *BioRxiv*, 2002, 2022.02.26.482041. doi: 10.1101/2022.02.26.482041.

Авторы:

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

Данченко И.Ю. — к.м.н., ассистент кафедры неврологии и медицинской генетики ФГБОУ ВО «Пермский государственный медицинский университет им. акад. Е.А. Вагнера» Минздрава России, г. Пермь, Россия

Байдина Т.В. — д.м.н., профессор кафедры неврологии и медицинской генетики ФГБОУ ВО «Пермский государственный медицинский университет им. акад. Е.А. Вагнера» Минздрава России, г. Пермь, Россия

Authors:

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

Danchenko I.Yu., PhD (Medicine), Assistant Professor, Department of Neurology and Medical Genetics, Perm State Medical University named after E.A. Wagner of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Perm, Russian Federation

Baidina T.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Neurology and Medical Genetics, Perm State Medical University named after E.A. Wagner of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Perm, Russian Federation

Поступила 17.03.2025
Отправлена на доработку 09.05.2025
Принята к печати 25.05.2025

Received 17.03.2025
Revision received 09.05.2025
Accepted 25.05.2025

ВЛИЯНИЕ ЦИТОКИНОВ НА ТОЛЕРАНТНОСТЬ МАКРОФАГОВ К ЛИПОПОЛИСАХАРИДУ

Эрдынеева Д.Б.^{1,2}, Никифоров Н.Г.^{1,3}, Верховова С.С.^{1,4},
Орехов А.Н.¹, Кулагова Т.А.¹

¹ ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», Москва, Россия

² ФГАОУ ВО «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)»,
г. Долгопрудный, Московская обл., Россия

³ ФГБУН «Институт биологии гена» Российской академии наук, Москва, Россия

⁴ ФГБНУ «Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского», Москва, Россия

⁵ Научно-исследовательское учреждение «Институт ядерных проблем» Белорусского государственного
университета, г. Минск, Республика Беларусь

Резюме. Макрофаги имеют огромное значение в работе иммунной системы, будучи важными участниками врожденного иммунитета. Они способны как напрямую бороться с патогенами, так и опосредованно, регулируя работу окружающих клеток через биологически активные вещества. В ответ на различные стимулы макрофаги из базального состояния могут переходить в про- или противовоспалительное, поляризуясь в M1- или M2-фенотип. M1-макрофаги обладают провоспалительным фенотипом, где макрофаги активируются под воздействием липополисахарида клеточной стенки грамотрицательных бактерий или некоторых провоспалительных цитокинов. M2-макрофаги приобретают противовоспалительный фенотип при активации некоторых рецепторов иммунного ответа (Fcγ и TLR), цитокинами IL-4, IL-13, IL-10 и при других стимулах. Также макрофаги способны ослаблять свой иммунный ответ в зависимости от длительности и/или кратности воспалительного сигнала и формировать к нему толерантность. Особое значение имеет толерантность к бактериальному липополисахариду, в ходе которого макрофаги приобретают рефрактерность к повторной стимуляции по сравнению с первичной, продуцируя меньше цитокинов и хемокинов. В нашем исследовании мы оценили роль цитокинов и хемокинов CCL2, CXCL1, CXCL9, CXCL12, IL-1β, IL-4, IL-6, IL-7, IL-8, IL-15, IL-22, TNFα на иммунный ответ макрофагов на липополисахарид и формирование толерантности. Первичные моноциты были получены из венозной крови здоровых доноров. Для стимуляции моноцитов и дифференцированных из них макрофагов использовался липополисахарид *E. coli*. Нами было показано, что предварительная обработка первичных макрофагов человека рекомбинантными цитокинами IL-4 и TNFα усиливает воспалительный ответ при повторной стимуляции липополисахаридом, то есть ослабляет развитие толерантности. Данный эффект выражался в усилении выработ-

Адрес для переписки:

Эрдынеева Даяна Батовна
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
общей патологии и патофизиологии»
125315, Россия, Москва, ул. Балтийская, 8.
Тел.: 8 (983) 430-70-24.
E-mail: daya-na@mail.ru

Address for correspondence:

Dayana B. Erdynneeva
Research Institute of General Pathology
and Pathophysiology
8 Baltiyskaya St
Moscow
125315 Russian Federation
Phone: +7 (983) 430-70-24.
E-mail: daya-na@mail.ru

Образец цитирования:

Д.Б. Эрдынеева, Н.Г. Никифоров, С.С. Верховова,
А.Н. Орехов, Т.А. Кулагова «Влияние цитокинов
на толерантность макрофагов к липополисахариду»
// Российский иммунологический журнал, 2025. Т. 28,
№ 3. С. 381-386.
doi: 10.46235/1028-7221-17192-IOC

© Эрдынеева Д.Б. и соавт., 2025

Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

D.B. Erdynneeva, N.G. Nikiforov, S.S. Verkhova,
A.N. Orekhov, T.A. Kulagova "Influence of cytokines on
macrophage tolerance to lipopolysaccharide", *Russian Journal
of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal*, 2025,
Vol. 28, no. 3, pp. 381-386.
doi: 10.46235/1028-7221-17192-IOC

© Erdynneeva D.B. et al., 2025

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

DOI: 10.46235/1028-7221-17192-IOC

ки цитокинов — TNF α , IL-6, IL-10 и хемокина IL-8 для рекомбинантного IL-4 и TNF α для рекомбинантного TNF α . При этом рекомбинантный IL-4 оказался также способен усиливать воспалительный сигнал макрофагов при однократной стимуляции липополисахаридом, увеличивая секрецию TNF α и IL-8. Таким образом, мы показали, что некоторые цитокины могут влиять на толерантность макрофагов к липополисахариду. В этом явлении может быть задействован переход макрофагов из одной поляризации в другую или в промежуточную форму. Модулирование фенотипа и иммунного ответа макрофагов открывает путь к созданию новых терапевтических подходов к воспалительным заболеваниям, в патогенезе которых развитие толерантности к липополисахариду играет немалую роль — таким как сепсис и атеросклероз.

Ключевые слова: макрофаги, моноциты, толерантность, воспаление, цитокины, липополисахарид, LPS

INFLUENCE OF CYTOKINES ON MACROPHAGE TOLERANCE TO LIPOPOLYSACCHARIDE

Erdyneeva D.B.^{a, b}, Nikiforov N.G.^{a, c}, Verkhova S.S.^{a, d}, Orekhov A.N.^a, Kulagova T.A.^e

^a Research Institute of General Pathology and Pathophysiology, Moscow, Russian Federation

^b Moscow Institute of Physics and Technology (National Research University), Dolgoprudny, Moscow Region, Russian Federation

^c Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

^d B. Petrovsky Russian Research Center of Surgery, Moscow, Russian Federation

^e Research Institute for Nuclear Problems, Belarusian State University, Minsk, Republic of Belarus

Abstract. Macrophages have great significance in immune response, being important participants in innate immunity. They are capable of both directly and indirectly fighting pathogens by regulating the surrounding cells *via* biologically active substances. In response to various stimuli, macrophages may switch from basal state to a pro- or anti-inflammatory state, polarizing into the M1 or M2 phenotype. M1 macrophages have a pro-inflammatory phenotype, being activated under the influence of cell wall lipopolysaccharide from Gram-negative bacteria, or some pro-inflammatory cytokines. M2 macrophages acquire an anti-inflammatory phenotype upon activation of some immune response receptors (Fc γ and TLR), cytokines IL-4, IL-13, IL-10 and other stimuli. Macrophages are also capable of alleviating their immune response depending on the duration and/or frequency of inflammatory signal, thus developing immune tolerance effect. Of particular importance is tolerance to bacterial lipopolysaccharide, when the macrophages acquire refractoriness to repeated stimulation compared to the primary one, producing less cytokines and chemokines. The aim of our study was to assess the role of cytokines and chemokines CCL2, CXCL1, CXCL9, CXCL12, IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-7, IL-8, IL-15, IL-22, TNF α on immune response of macrophages to lipopolysaccharide and emergence of immune tolerance. Primary monocytes were obtained from venous blood of healthy donors. *E. coli* lipopolysaccharide (LPS) was used to stimulate monocytes and differentiated macrophages. We have shown that pre-treatment of primary human macrophages with recombinant cytokines IL-4 and TNF α enhances the inflammatory response to repeated stimulation with lipopolysaccharide, i.e. weakens the development of tolerance. This effect was expressed as increased production of cytokines (TNF α , IL-6, IL-10) and IL-8 chemokine in presence of recombinant IL-4, and TNF α production with recombinant TNF α . At the same time, recombinant IL-4 was also able to enhance the inflammatory signal of macrophages upon a single LPS stimulation, thus increasing the TNF α and IL-8 secretion. We have shown that some cytokines may affect the tolerance of macrophages to LPS. This phenomenon may involve transition of macrophages from one polarization state to another, or to an intermediate step. Modulation of macrophage phenotype and its immune response opens the way to the development of new therapeutic approaches to inflammatory diseases, where tolerance to lipopolysaccharide plays a significant role in pathogenesis, such as sepsis and atherosclerosis.

Keywords: macrophages, monocytes, tolerance, inflammation, cytokines, lipopolysaccharide, LPS

Исследование выполнено при поддержке гранта РНФ № 25-25-00292.

Введение

Макрофаги являются ключевыми эффекторами врожденного иммунитета и также задействованы в работе адаптивного иммунитета. При этом они способны не только напрямую фагоцитировать патогены, но также и выполнять регуляторную роль. При активации макрофаги переходят из гомеостатического фенотипа в провоспалительный для борьбы с патогеном. В то же время для восстановления гомеостаза и контроля чрезмерной воспалительной реакции организма макрофаги, напротив, могут переходить в противовоспалительный фенотип. Нарушение функции макрофагов приводит к развитию множества заболеваний воспалительного генеза.

Пластичность макрофагов заключается в различных направлениях их поляризации. В упрощенном виде существуют два подтипа макрофагов: M1 и M2, отличающиеся своими функциями. M1-макрофаги обладают провоспалительным фенотипом, продуцируя токсичные для патогенов вещества (например, активные формы кислорода и NO), воспалительные цитокины, участвуют в ответах Th1, а также подавляют пролиферацию клеток. M2, напротив, обладают противовоспалительным фенотипом, способствуют пролиферации клеток и регенерации тканей, участвуют в Th2-ответах. При этом нарушение их нормальной функции может привести к различным патологическим состояниям [5].

Важным событием в жизни макрофага является его активация при встрече с молекулярными паттернами, ассоциированными с патогенами (PAMP) или повреждением (DAMP). Данный процесс опосредуется через специальные рецепторы — PRR, к которым принадлежат Толл-подобные рецепторы (TLR). Наиболее известным среди них является TLR4, который способен связываться с липополисахаридом (LPS), основным компонентом клеточной стенки грамотрицательных бактерий.

LPS индуцирует выработку различных хемокинов и про- и противовоспалительных цитокинов, таких как CCL2, IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-15, TNF α , TGF β и т. д. Липополисахарид бактерий, колонизирующих различные органы человека, может быть источником различных воспалительных состояний, вплоть до болезней, на первый взгляд не имеющих инфекционную этиологию, таких как атеросклероз [4].

M1-макрофаги активируются LPS и другими веществами, связанными с патогенными микроорганизмами, а также провоспалительными цитокинами TNF α и IFN γ . M2-макрофаги поляри-

зуются противовоспалительными цитокинами (IL-4 и IL-13 для M2a-подтипа, IL-10 и TGF- β для M2c-подтипа), активацией рецепторов Fc γ и TLR (M2b), и т. д. [6]. Макрофаги могут изменять функциональный профиль под действием различных стимулов, переключаясь между типами поляризации. Так, транскриптомный анализ показал, что при последовательном изменении условий среды, т. е. добавления ЛПС, про- и противовоспалительных цитокинов, поляризованные M1-макрофаги могут переходить в фенотип M2 [6]. Также было обнаружено, что стимуляция TLR3 меняет поляризацию мышинных M2 в M1-подтип, способствуя регрессии опухоли [11]. А стимуляция TLR2-рецептора M2-макрофагов, полученных из крови человека, снижало их противовоспалительную активность, таким образом способствуя переходному M1/M2-подтипу [9]. Известно, что при повторном воздействии LPS на макрофаги, вторичный воспалительный ответ будет менее сильным — так называемое явление толерантности к липополисахариду. Толерантность к LPS может защитить организм от агрессивного воздействия провоспалительных цитокинов — цитокинового шторма, однако параллельно при этом повышается риск ослабления защиты перед патогенами. Явление толерантности к LPS задействовано в патогенезе различных хронических воспалительных заболеваний [3].

Целью нашего исследования было изучить влияние различных цитокинов и хемокинов на иммунный ответ макрофагов в условиях толерантности к липополисахариду.

Материалы и методы

Для выделения РВМС использовалась венозная кровь 3 здоровых доноров. Методом иммуномагнитной сепарации из полученных мононуклеарных клеток были выделены CD14⁺ моноциты. Клетки культивировались в 48-луночных планшетах (1 $\times$ 10⁶ клеток/мл в 500 мкл) в среде в среде RPMI-1640 с добавлением 2 mM L-глутамина (НПП «ПанЭко», Россия), пенициллин-стрептомицина (НПП «ПанЭко», Россия), 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ООО «БиолоТ», Россия) и GM-CSF (50 нг/мл, SCI-STORE, Россия).

На 4-й день после выделения моноцитам сменяли среду на свежую для продолжения дифференцировки в макрофаги. На 6-й день к макрофагам в свежей культуральной среде добавлялся один из рекомбинатных цитокинов/хемокинов человека (10 нг/мл): (rhCCL2, rhCXCL1, rhCXCL9, rhCXCL12, rhIL-1 β , rhIL-4, rhIL-6, rhIL-7, rhIL-8, rhIL-15, rhIL-22, rhTNF α). Клетки инкубировались 4 часа в присутствии цитокина/хемокина, затем после смены среды у полови-

ны клеток происходила первая стимуляция LPS *E. coli* (100 нг/мл, Sigma-Aldrich, США). На 7-й день после выделения LPS после 1-х суток инкубации с LPS сменялась культуральная среда (при этом кондиционированная среда замораживалась для последующего ИФА). На 11-й день происходила новая стимуляция LPS макрофагов уже во всех лунках. На 12-й день после суток инкубации с LPS собиралась среда и замораживалась для ИФА.

ИФА цитокинов в кондиционированной среде (TNF α , CCL2, IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10) проводился с помощью наборов DuoSet ELISA Development kit (R&D Systems, США) и микропланшетного ридера Tecan Infinite F500.

Статистический анализ проводился с использованием t-критерия Стьюдента для независимых выборок при уровне значимости $p < 0,05$ с помощью программы JASP 0.19.3 и GraphPad Prism 8.

Результаты и обсуждение

В ходе нашего исследования было проведено 12 рекомбинантных хемокинов и цитокинов (rhCCL2, rhCXCL1, rhCXCL9, rhCXCL12, rhIL-1 β , rhIL-4, rhIL-6, rhIL-7, rhIL-8, rhIL-15, rhIL-22, rhTNF α) на способность изменять иммунный ответ макрофагов при однократной (как на 6-й день после выделения, так и на 11-й день) и двукратной стимуляции LPS. Однако статистически значимые результаты были получены только для rhIL-4 и rhTNF α .

Обнаружено, что предварительная обработка макрофагов человека рекомбинантным rhIL-4 повышает секрецию TNF α , IL-6, IL-8 и IL-10 по-

сле повторной стимуляции LPS по сравнению с контролем (рис. 1).

Примечательно, что обработанные rhIL-4 макрофаги, которым на 11-й день после выделения в первый раз был добавлен LPS, также увеличивают продукцию TNF α и IL-8 по сравнению с контролем (рис. 2).

Также было выявлено, что обработка рекомбинантным rhTNF α способствует повышению концентрации TNF α в кондиционированной среде макрофагов после повторной стимуляции LPS (рис. 3).

Таким образом, предварительная обработка rhIL-4 и rhTNF α усиливала воспалительный ответ макрофагов при повторной стимуляции LPS по сравнению с контролем, демонстрируя снижение толерантности к эндотоксину. При этом rhIL-4 также способствовала усилению иммунного ответа при однократной стимуляции LPS.

Известно, что IL-4 способствует поляризации макрофагов в противовоспалительный M2-фенотип. Согласно данным литературы, предварительная обработка макрофагов IL-4 может усиливать иммунный ответ на LPS. В работе Stout et al. (2005) было показано, что предварительная обработка IL-4 или IFN γ усиливала секрецию воспалительных цитокинов TNF α и IL-12 и подавляла продукцию IL-10 в ответ на стимуляцию LPS. Интересно, что IFN γ подавлял продукцию CCL2, а IL-4 ее усиливал [10]. В исследовании Li et al. (2023) индукция цисаконитатдекарбоксилазы (IRG-1), опосредованная ЛПС, была нарушена как в поляризованных IFN γ макрофагах M1, так и в поляризованных

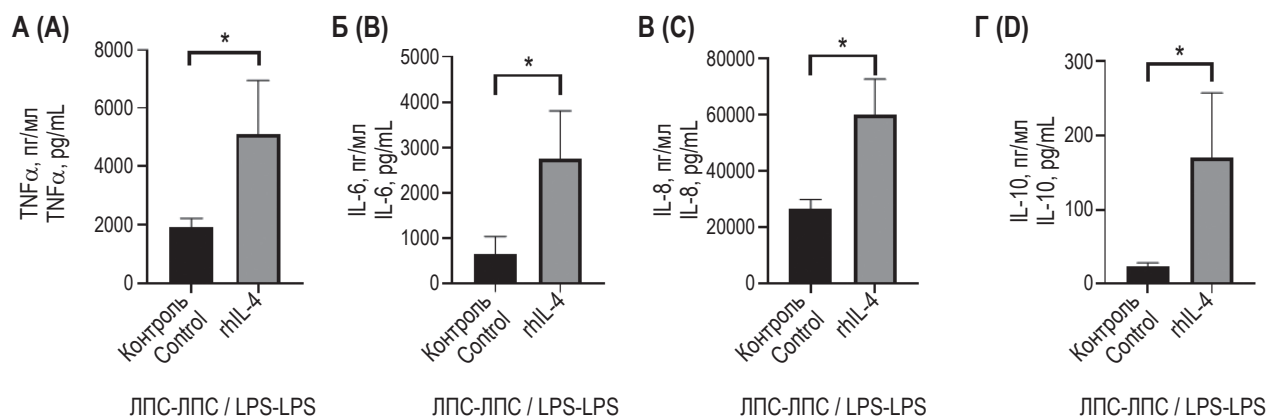


Рисунок 1. Влияние rhIL-4 на толерантность макрофагов к LPS (после повторной стимуляции)

Примечание. $n = 3$. Результаты представлены в виде среднего и стандартного отклонения. * – различия $p < 0,05$ по сравнению с контролем без добавления рекомбинантного цитокина. А – значения секреции макрофагами TNF α в пкг/мл. Б – значения секреции IL-6 в пкг/мл. В – значения секреции IL-8 в пкг/мл. Г – значения секреции IL-10 в пкг/мл.

Figure 1. Effect of rhIL-4 on macrophage tolerance to LPS (after repeated stimulation)

Note. $n = 3$. Results are presented as mean and standard deviation. *, differences $p < 0.05$ compared to control without addition of recombinant cytokine. A, values of TNF α secretion by macrophages in pg/mL. B, values of IL-6 secretion in pg/mL. C, values of IL-8 secretion in pg/mL. D, values of IL-10 secretion in pg/mL.

IL-4 макрофагах M2 при двойной стимуляции, при этом экспрессия гемоксигеназы-1 (HO-1) была выше в M2-макрофагах. А в присутствии диметил итаконата, известного своими иммуномодулирующими свойствами, те же M2-макрофаги демонстрировали повышенную секрецию TNF α и IL-6 после стимуляции LPS [7]. Результаты нашего исследования сходятся с данными литературы, однако стимулирующий эффект IL-4 проявился также при повторной стимуляции LPS, даже сильнее, чем при однократной стимуляции, что требует более подробных исследований.

Данные литературы довольно противоречивы касательно влияния TNF α на последующую стимуляцию LPS. Например, TNF α и LPS индуцируют перекрестную толерантность в клетках линии острого моноцитарного лейкоза THP-1 [2]. На первичных макрофагах человека было показано, что предварительное воздействие TNF α вызывает толерантность к LPS через активацию фермента GSK3 [8]. Однако в исследовании Li et al. (2023) было показано, что предварительная обработка TNF α первичных макрофагов, полученных из моноцитов крови человека, повышает секрецию TNF α и IL-6, как после единичной, так и после повторной стимуляции липополисахаридом. При этом авторы утверждают, что сам TNF α не влияет на толерантность, а лишь усиливает продукцию цитокинов в ответ на стимуляцию LPS [7]. Наши результаты более схожи с результатами последней статьи, но при этом rhTNF α оказывал стимулирующий эффект только на толеризованные макрофаги. Возможно, в этом играет присутствие большой концентрации GM-CSF в среде, который также может влиять на развитие толерантности к LPS [1]. Очевидна необходимость в более подробном исследовании кросс-толерантности TNF α и LPS.

Выводы

Таким образом, данные нашего исследования показывают, что некоторые цитокины, такие как IL-4 и TNF α , способны модулировать эффективность толерантности макрофагов к липополисахариду. Однако все еще требуется более подробно изучить механизм взаимодействия цитокинов и липополисахарида в макрофагах, особенно в контексте толерантности к LPS. Исследования по данной тематике позволят создать новые подходы к лечению хронических воспалительных заболеваний.

Благодарности

Авторы благодарят Центр коллективного пользования ИБГ РАН за возможность использования научного оборудования.

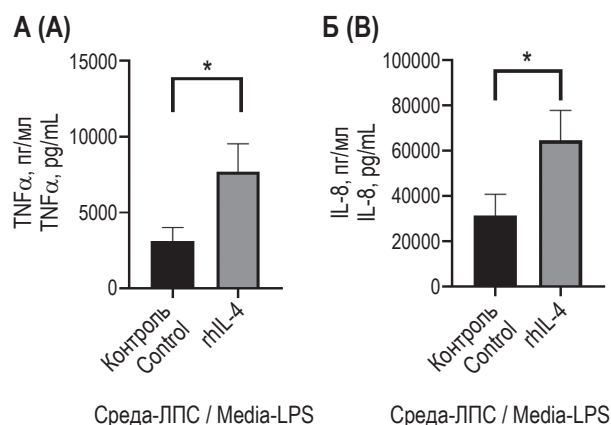


Рисунок 2. Влияние rhIL-4 на секрецию цитокинов макрофагами при однократной стимуляции LPS

Примечание. n = 3. Результаты представлены в виде среднего и стандартного отклонения. * – различия p < 0,05 по сравнению с контролем без добавления рекомбинантного цитокина. А – значения секреции макрофагами TNF α в пг/мл. Б – значения секреции IL-8 в пг/мл.

Figure 2. Effect of rhIL-4 on cytokine secretion by macrophages after a single stimulation with LPS

Note. n = 3. Results are presented as mean and standard deviation. *, differences p < 0.05 compared to the control without the addition of recombinant cytokine. A, values of TNF α secretion by macrophages in pg/mL. B, values of IL-8 secretion in pg/mL.

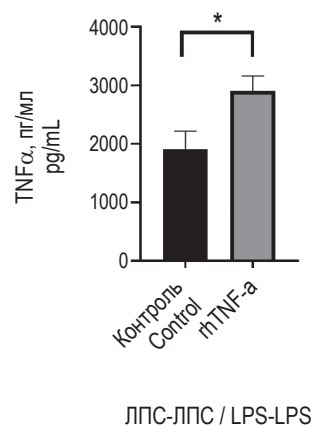


Рисунок 3. Влияние rhTNF α на секрецию макрофагами TNF α при однократной стимуляции LPS

Примечание. n = 3. Результаты представлены в виде среднего и стандартного отклонения. * – различия p < 0,05 по сравнению с контролем без добавления рекомбинантного цитокина.

Figure 3. Effect of rhTNF α on TNF- α secretion by macrophages after a single LPS stimulation

Note. n = 3. Results are presented as mean and standard deviation. *, differences p < 0.05 compared to the control without the addition of recombinant cytokine.

Список литературы / References

1. Collins P.E., Carmody R.J. The regulation of endotoxin tolerance and its impact on macrophage activation. *Crit. Rev. Immunol.*, 2015, Vol. 35, no. 4, pp. 293-323.
2. Ferlito M., Romanenko O.G., Ashton S., Squadrito F., Halushka P.V., Cook J.A. Effect of cross-tolerance between endotoxin and TNF-alpha or IL-1beta on cellular signaling and mediator production. *J. Leukoc. Biol.*, 2001, Vol. 70, no. 5, pp. 821-829.
3. Gillen J., Ondee T., Gurusamy D., Issara-Amphorn J., Manes N.P., Yoon S.H., Leelahavanichkul A., Nita-Lazar A. LPS tolerance inhibits cellular respiration and induces global changes in the macrophage secretome. *Biomolecules*, 2021, Vol. 11, no. 2, 164. doi: 10.3390/biom11020164.
4. Gorabi A.M., Kiaie N., Khosrojerdi A., Jamialahmadi T., Al-Rasadi K., Johnston T.P., Sahebkar A. Implications for the role of lipopolysaccharide in the development of atherosclerosis. *Trends Cardiovasc. Med.*, 2022, Vol. 32, no. 8, pp. 525-533.
5. Italiani P., Boraschi D. From monocytes to M1/M2 macrophages: phenotypical vs. Functional differentiation. *Front. Immunol.*, 2014, Vol. 5, 514. doi: 10.3389/fimmu.2014.00514.
6. Italiani P., Mazza E.M., Lucchesi D., Cifola I., Gemelli C., Grande A., Battaglia C., Biccato S., Boraschi D. Transcriptomic profiling of the development of the inflammatory response in human monocytes in vitro. *PLoS One*, 2014, Vol. 9, no. 2, e87680. doi: 10.1371/journal.pone.0087680.
7. Li H., Breedijk A., Dietrich N., Nitschke K., Jarczyk J., Nuhn P., Krämer B.K., Yard B.A., Leipe J., Hauske S. Lipopolysaccharide tolerance in human primary monocytes and polarized macrophages. *Int. J. Mol. Sci.*, 2023, Vol. 24, no. 15, 12196. doi: 10.3390/ijms241512196.
8. Park S.H., Park-Min K.H., Chen J., Hu X., Ivashkiv L.B. Tumor necrosis factor induces GSK3 kinase-mediated cross-tolerance to endotoxin in macrophages. *Nat. Immunol.*, 2011, Vol. 12, no. 7, pp. 607-615.
9. Quero L., Hanser E., Manigold T., Tieden A.N., Kyburz D. TLR2 stimulation impairs anti-inflammatory activity of M2-like macrophages, generating a chimeric M1/M2 phenotype. *Arthritis Res. Ther.*, 2017, Vol. 19, no. 1, 245. doi: 10.1186/s13075-017-1447-1.
10. Stout R.D., Jiang C., Matta B., Tietzel I., Watkins S.K., Suttles J. Macrophages sequentially change their functional phenotype in response to changes in microenvironmental influences. *J. Immunol.*, 2005, Vol. 175, no. 1, pp. 342-349.
11. Vidyarthi A., Khan N., Agnihotri T., Negi S., Das D.K., Aqdas M., Chatterjee D., Colegio O.R., Tewari M.K., Agrewala J.N. TLR-3 Stimulation Skews M2 Macrophages to M1 Through IFN- $\alpha\beta$ Signaling and Restricts Tumor Progression. *Front. Immunol.*, 2018, Vol. 9, 1650. doi: 10.3389/fimmu.2018.01650.

Авторы:

Эрдынеева Д.Б. — старший лаборант лаборатории ангиопатологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», Москва; аспирант ФГАОУ ВО «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)», г. Долгопрудный, Московская обл., Россия

Никифоров Н.Г. — к.б.н., научный сотрудник лаборатории ангиопатологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»; младший научный сотрудник Центра коллективного пользования ФГБУН «Институт биологии гена» Российской академии наук, Москва, Россия

Верхова С.С. — старший лаборант лаборатории ангиопатологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»; аспирант ФГБНУ «Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского», Москва, Россия

Орехов А.Н. — д.б.н., заведующий лабораторией ангиопатологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», Москва, Россия

Кулагова Т.А. — к.б.н., сотрудник лаборатории нанoeлектромагнетизма Научно-исследовательского учреждения «Институт ядерных проблем» Белорусского государственного университета, г. Минск, Республика Беларусь

Authors:

Erdynееva D.B., Senior Laboratory Assistant, Laboratory of Angiopathology, Research Institute of General Pathology and Pathophysiology, Moscow; Postgraduate Student, Moscow Institute of Physics and Technology (National Research University), Dolgoprudny, Moscow Region, Russian Federation

Nikiforov N.G., PhD (Biology), Researcher, Laboratory of Angiopathology, Research Institute of General Pathology and Pathophysiology; Junior Researcher of Core Facility Center, Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Verkhova S.S., Senior Laboratory Assistant, Laboratory of Angiopathology, Research Institute of General Pathology and Pathophysiology; Postgraduate Student, B. Petrovsky Russian Research Center of Surgery, Moscow, Russian Federation

Orekhov A.N., PhD, MD (Biology), Head, Laboratory of Angiopathology, Research Institute of General Pathology and Pathophysiology, Moscow, Russian Federation

Kulagova T.A., PhD (Biology), Researcher, Laboratory of Nanoelectromagnetism, Research Institute for Nuclear Problems, Belarusian State University, Minsk, Republic of Belarus

Поступила 29.03.2025

Отправлена на доработку 01.04.2025

Принята к печати 25.05.2025

Received 29.03.2025

Revision received 01.04.2025

Accepted 25.05.2025

ВЛИЯНИЕ ЭСТРИОЛА НА ПРОЛИФЕРАТИВНУЮ АКТИВНОСТЬ РЕГУЛЯТОРНЫХ СУБПОПУЛЯЦИЙ ТИМОЦИТОВ

Некрасова И.В., Логинова О.А., Орлова Е.Г.

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. Стероидный гормон эстриол (E_3), синтезируемый фетоплацентарной единицей, эффективно регулирует функционирование не только репродуктивных тканей, но и иммунных клеток. Одним из ключевых механизмов поддержания иммунологической толерантности в период гестации является изменение соотношения регуляторных подгрупп лимфоцитов — IL-17-продуцирующих (Th17) и Т-регуляторных (Treg). Также важную роль при беременности играют инвариантные естественные киллерные Т-клетки (iNKT), обладающие как цитотоксической, так и иммунорегуляторной активностью. Процесс дифференцировки данных подтипов лимфоцитов начинается в тимусе. Цель работы — изучить влияние E_3 на субпопуляционный состав регуляторных клеток (Th17, Treg, iNKT) тимуса *in vitro*. Тимоциты культивировали 72 ч с E_3 в концентрации 20 нг/мл, характеризующей его максимальный уровень в периферической крови при беременности, в присутствии CD3/CD28-активирующих частиц и далее оценивали субпопуляционный состав регуляторных клеток и экспрессию в них Ki-67 методом проточной цитометрии. Тимические nTreg-клетки определяли как процент $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ клеток; Th17-клетки оценивали как процент $CD4^+IL-17A^+ROR\gamma t^+$ клеток; количество iNKT-клеток определяли как процент $CD3^{hi}Va24Ja18^+$ клеток в культуре тимоцитов. Пролиферативный потенциал Treg, Th17 и iNKT-клеток оценивали по экспрессии Ki-67 в гейте соответствующей клеточной субпопуляции. Установлено, что E_3 угнетает дифференцировку стимулированных CD3/CD28 частицами тимоцитов в направлении nTreg и усиливает формирование iNKT. На количество Ki-67-позитивных nTreg и iNKT-клеток статистически значимого влияния гормон не оказал, однако имелась тенденция к снижению данного показателя. E_3 не влияет на изменение общего количества Th17 регуляторного подтипа тимоцитов, но при этом угнетает пролиферативный ответ данной субпопуляции. Таким образом, в присутствии антигенной нагрузки E_3 в концентрации, характерной для конца беременности, меняет свой классический эффект на противоположный, защищая организм матери от потенциальной опасности. Так, гормон усиливает образование iNKT и угнетает формирование nTreg из тимоцитов. При этом E_3 негативно регулирует пролиферативную способность тимических Th17-клеток, компенсируя снижение количества nTreg и предотвращая возможность преждевременных родов. Поскольку известно, что беременность сопровождается стероидиндуциро-

Адрес для переписки:

Некрасова Ирина Валерьевна
Институт экологии и генетики микроорганизмов
Уральского отделения Российской академии наук
614081, Россия, г. Пермь, ул. Голева, 13.
Тел.: 8 (342) 280-84-31.
Факс: 8 (342) 280-92-11.
E-mail: nirina5@mail.ru

Address for correspondence:

Irina V. Nekrasova
Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms
13 Golev St
Perm
614081 Russian Federation
Phone: +7 (342) 280-84-31.
Fax: +7 (342) 280-92-11.
E-mail: nirina5@mail.ru

Образец цитирования:

И.В. Некрасова, О.А. Логинова, Е.Г. Орлова «Влияние эстриола на пролиферативную активность регуляторных субпопуляций тимоцитов» // Российский иммунологический журнал, 2025. Т. 28, № 3. С. 387-392. doi: 10.46235/1028-7221-17166-EEO

© Некрасова И.В. и соавт., 2025
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

I.V. Nekrasova, O.A. Loginova, E.G. Orlova "Estradiol effect on proliferative activity of regulatory thymocyte subpopulations", Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2025, Vol. 28, no. 3, pp. 387-392. doi: 10.46235/1028-7221-17166-EEO

© Nekrasova I.V. et al., 2025
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.46235/1028-7221-17166-EEO

ванной атрофией тимуса, нами продемонстрирован один из возможных механизмов, лежащих в основе данного процесса, с участием гормона беременности E_3 .

Ключевые слова: беременность, эстриол, тимоциты, *aTreg*, *Th17*, *iNKT*

ESTRIOL EFFECT ON PROLIFERATIVE ACTIVITY OF REGULATORY THYMOCYTE SUBPOPULATIONS

Nekrasova I.V., Loginova O.A., Orlova E.G.

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

Abstract. Estriol (E_3) is a steroid hormone synthesized by fetoplacental unit which effectively regulates reproductive tissues and functioning of immune cells. A changing ratio in regulatory lymphocyte subsets, i.e., IL-17-producing cells (*Th17*) and regulatory T cells (*Treg*) is one of key mechanisms for maintaining immunological tolerance during pregnancy. Invariant natural killer T cells (*iNKT*), which have both cytotoxic and immunoregulatory activity, also play an important role during the gestation period. Differentiation of these lymphocyte subtypes begins in thymus gland. The aim of our work was to study the *in vitro* effect of E_3 upon composition of thymic regulatory cells subpopulations (*Th17*, *Treg*, *iNKT*). Thymocytes were cultured for 72 h with E_3 at a concentration of 20 ng/ml, which corresponds to its maximum level in peripheral blood during pregnancy, with CD3/CD28-activated particles, then followed by flow cytometry-based assessment of regulatory cells subpopulations and Ki-67 expression. Thymic *nTreg* cells were defined as percentage of $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ cells; *Th17* cells were defined as $CD4^+IL-17A^+ROR\gamma^t^+$ cells; *iNKT* cells were determined as percentage of $CD3^{hi}Va24Ja18^+$ cells in thymocyte culture. *Treg*, *Th17*, and *iNKT* proliferative potential was estimated by Ki-67 expression. E_3 inhibited differentiation of CD3/CD28- stimulated thymocytes towards *nTreg* and enhanced *iNKT* formation. The hormone did not significantly affect Ki-67⁺ *nTreg* and *iNKT* cells numbers, however, with a trend for decrease. E_3 did not influence *Th17* numbers but inhibited its proliferative response in this subset. Hence, E_3 changes its classical effect to the opposite direction in the presence of an antigen, protecting mother's body from potential danger. Estriol was shown to enhance *iNKT* formation and inhibited *nTreg* formation from thymocytes. At the same time, E_3 showed downregulation of thymic *Th17* cells proliferation, thus compensating the decreased *nTreg* number, and preventing premature birth risk. Since pregnancy is known to be associated with steroid-induced thymus atrophy, we have suggested a possible mechanism underlying this process, involving the pregnancy hormone E_3 .

Keywords: pregnancy, estriol, thymocytes, *aTreg*, *Th17*, *iNKT*

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

Введение

Беременность приводит к значительным изменениям в эндокринном статусе женщины, что выражается в увеличении продукции множества гормонов и появлении в значительных количествах ранее не детектируемых веществ. Одним из ключевых гормонов, синтез которых в значительной степени связан с беременностью, является эстриол (E_3), который вырабатывается фетоплацентарной единицей. Уровень E_3 у беременных женщин увеличивается с 7-й недели

беременности и достигает почти десятикратного повышения к моменту родов. Кроме выполнения функций, схожих с другими эстрогенами, E_3 может служить маркером, отражающим состояние фетоплацентарного комплекса, поскольку его синтез требует скоординированной работы ферментативных систем как плаценты, так и плода. Кроме того, установлено, что данный гормон эффективно регулирует функционирование не только репродуктивных тканей, но и иммунных клеток [13].

С иммунологической точки зрения беременность представляет собой процесс формирования толерантности иммунной системы матери к полуаллогенному плоду. Одним из ключевых механизмов поддержания иммунологической

толерантности в период беременности является изменение соотношения регуляторных подгрупп лимфоцитов — IL-17-продуцирующих (Th17) и Т-регуляторных (Treg), при котором наблюдается увеличение количества Treg с иммуносупрессивной активностью [15]. Treg представляют собой специализированную подгруппу Т-клеток, которые играют ключевую роль в предотвращении аутоиммунных реакций и отторжения трансплантата, угнетая Т-клеточный ответ. В то же время цитокин IL-17, продуцируемый Th17-клетками, выполняет провоспалительную функцию и существенно влияет на индукцию воспалительных процессов, развитие аутоиммунных заболеваний и отторжение трансплантата. Изменение баланса клеточных подтипов в сторону увеличения Th17 во время беременности связано с риском преждевременных родов или спонтанного аборта [15]. Установлено, что на тимическом этапе наивные CD4⁺Т-лимфоциты под влиянием гормонов дифференцируются в натуральные Treg (nTreg) и Th17 [8].

Инвариантные естественные киллерные Т-клетки (iNKT), представляющие собой Т-лимфоциты с функциями естественных киллеров, обладают как цитотоксической, так и иммунорегуляторной активностью. Процесс дифференцировки iNKT-клеток происходит в тимусе из CD4⁺CD8⁺ тимоцитов [8]. Исследования показывают, что при нормальном течении беременности наблюдается снижение количества iNKT-клеток в периферической крови, в то время как их увеличение связано со спонтанными абортми и преэклампсией [9]. Несмотря на то, что доля iNKT-клеток в периферической крови составляет всего около 1,2% от общего числа Т-клеток, они обладают способностью к быстрой и значительной продукции цитокинов, что подчеркивает их важность в регуляции иммунных реакций [5].

Цель работы — изучить влияние E₃ на субпопуляционный состав регуляторных клеток (Th17, Treg, iNKT) тимуса *in vitro*.

Материалы и методы

Тимоциты получали из фрагментов тимусов, удаляемых в ходе сердечно-сосудистых операций у детей до года при коррекции врожденных пороков сердца в соответствии с существующей хирургической практикой Федерального краевого центра сердечно-сосудистой хирургии г. Перми. Исследования проводились согласно Хельсинкской декларации ВМА 2000 г. и Конвенции Совета Европы «О правах человека и биомедицине» 1999 г. и одобрены локальным этическим комитетом ИЭГМ УрО РАН (протокол от 01.07.2016). Обязательным критерием включения являлось наличие добровольного согласия со стороны за-

конных представителей несовершеннолетних. Фрагменты тимуса помещали в полную питательную среду (ППС) (RPMI-1640 с GlutaMAX™-I (Gibco, Великобритания), с добавлением пенициллина 50 мкг/мл и стрептомицина 50 нг/мл, 10%-ной фетальной бычьей сыворотки, 25 мм HEPES (Gibco, Великобритания). Тимоциты получали путем легких надавливаний пинцетом на фрагменты тимуса. Полученную суспензию клеток трижды отмывали в фосфатно-солевом буфере, клетки подсчитывали и ресуспендировали в ППС, а затем вносили по 1 мл (1×10^7 кл/мл) в лунки 24-луночного полистиролового планшета и инкубировали с гормоном 72 ч при 37 °С в условиях 5% CO₂.

E₃ (ICN Biomedicals Inc., США) вносили в культуры в концентрации 20 нг/мл, соответствующей его максимальному уровню в периферической крови при беременности [13].

Созревание тимоцитов индуцировали с использованием CD3/CD28-частиц (Gibco, LifeTechnologies AS, Норвегия), обеспечивающих активацию клеток через Т-клеточный рецептор с коstimуляцией. Тимические nTreg-клетки оценивали как процент FoxP3⁺ клеток в гейте CD4⁺CD25⁺ лимфоцитов (Human CD4⁺(FITC) CD25⁺(PE) regulatory T cell staining reagent, R&D, США; Anti-Human FoxP3 PerCP/Cy5.5, clone PCH101, eBioscience, США). Тимические Th17-клетки определяли как процент IL-17A⁺ клеток в гейте CD4⁺RORγt⁺ лимфоцитов (IL-17A FITC BL168, BioLegend, США; CD4 PE, clone RPA-T4, BioLegend, США; Anti-human/mouse RORγt/RORc2 PerCP, R&D, США). Количество iNKT-клеток определяли как процент CD3^{hi}Vα24Jα18⁺ клеток (Anti-Human CD3 PE-Cy5, clone UCHT1, eBioscience, США; Anti-Human Vα24Jα18 TCR PE, clone 6B11, eBioscience, США) в гейте лимфоцитов. Пролиферативный потенциал Treg, Th17 и iNKT-клеток оценивали по экспрессии Ki-67 (Brilliant Violet 421, clone Ki-67, BioLegend, США) в гейте соответствующей клеточной субпопуляции (nTreg, Th17, iNKT). Для определения внутриклеточных маркеров использовали набор специализированных буферов для транскрипционных факторов (True-Nuclear™, BioLegend, США) и соответствующий протокол. При анализе учитывали не менее 10 000 клеток. Для контроля неспецифического связывания и выделения негативного по флюоресценции окна использовали соответствующие изотипические контроли.

Статистический анализ выполнен в программе Prism 9 (GraphPad, США). Проверка нулевой гипотезы о нормальности распределения в выборке проводилась с помощью теста χ^2 . Результаты выражали в виде медианы с указанием нижнего и верхнего квартилей — Me (Q_{0,25}–Q_{0,75}).

Различия считали значимыми при $p < 0,05$. Достоверность различий между группами оценивали по критерию Вилкоксона для парных зависимых выборок.

Результаты и обсуждение

Установлено, что E_3 в концентрации, характерной для III триместра беременности, угнетает дифференцировку стимулированных CD3/CD28 частицами тимоцитов в направлении nTreg (рис. 1А), что указывает на роль гормона в снижении числа данных клеток на поздних сроках беременности [12]. Ранее нами показано, что гормон в данной концентрации усиливает образование адаптивных aTreg в культуре интактных мононуклеаров периферической крови небеременных женщин [13].

E_3 не влияет на изменение общего количества Th17 регуляторного подтипа тимоцитов, но при этом угнетает пролиферативный ответ данной субпопуляции (рис. 1А, Б). Необходимо отметить, что в отсутствие дополнительной стимуляции тимоцитов частицами CD3/CD28 действие гормона в отношении регуляции баланса Treg/Th17 не является статистически значимым [2].

В исследуемой концентрации E_3 усиливает формирование iNKT из стимулированных тимоцитов (рис. 1А). При этом нами показано, что гормон в этой же концентрации угнетает образо-

вание данного типа клеток в популяции интактных тимоцитов [1], а также, в низкой концентрации, — из мононуклеаров периферической крови [13]. Учитывая, что для начальных стадий развития и дифференцировки iNKT-клеток важна экспрессия транскрипционного фактора ROR γ t CD4⁺CD8⁺ тимоцитами [8], можно предположить, что обнаруженный эффект гормона связан со стимуляцией экспрессии ROR γ t. В то же время в норме процесса реализации негеномного эффекта E_3 повышается уровень цАМФ в клетках-мишенях [4], который усиливает экспрессию транскрипционного фактора FoxP3 [7], являющегося ингибитором экспрессии ROR γ t [11]. По-видимому, в случае дополнительной стимуляции тимоцитов частицами CD3/CD28 классический путь реализации гормонального эффекта меняется и происходит активация фактора ICER (inducible cAMP early repressor), экспрессия которого препятствует трансформации CD4⁺CD8⁺ тимоцитов в FoxP3⁺Treg [6]. Подавление экспрессии FoxP3 в свою очередь приводит к усилению экспрессии ROR γ t. Важно отметить, что гормон реализует свои эффекты в отношении nTreg и iNKT в концентрации, соответствующей концу беременности.

На количество Ki-67-позитивных iNKT-клеток, как и nTreg, статистически значимого влияния гормон не оказал, однако имелась тенденция к снижению данного показателя (рис. 1Б).

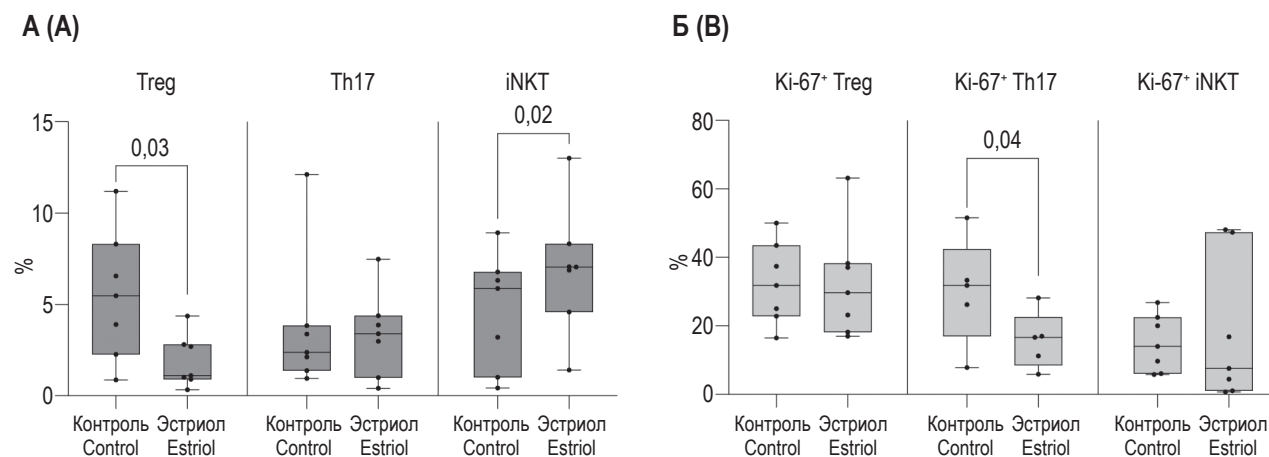


Рисунок 1. Процентное содержание регуляторных клеток (Treg, Th17, iNKT) в культурах тимоцитов, культивировавшихся 72 ч в присутствии CD3/CD28-активирующих частиц и эстриола или без эстриола (контроль) (А); процент Ki-67-экспрессирующих Treg, Th17, iNKT в этих культурах (Б)

Примечание. Результаты представлены в виде медианы с указанием нижнего и верхнего квартилей – Me ($Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$); достоверными считались значения $p < 0,05$. Представлены данные семи независимых экспериментов.

Figure 1. Percentage of regulatory cells (Treg, Th17, iNKT) in thymocyte cultures after 72 h cultivation in the presence of CD3/CD28 activating particles and estradiol or without estradiol (control) (A); percentage of Ki-67 expressing Treg, Th17, iNKT in these cultures (B)

Note. The results are presented as a median with a lower and upper quartile – Me ($Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$); differences are considered significant at $p < 0.05$. Data from seven independent experiments are presented.

Следует отметить, что все исследуемые субпопуляции тимоцитов являются высокодифференцированными и проявляют низкую пролиферативную активность. В предыдущих исследованиях нами показано, что E_3 обладает антипролиферативным, а также антиапоптотическим действием в отношении общего пула тимоцитов [3]. Исходя из этого, можно предположить, что наблюдаемая при нормальной беременности атрофия тимуса обусловлена в большей степени угнетением пролиферативной активности тимоцитов. Поскольку показано, что экспрессия эстрогенового рецептора- β , с которым преимущественно связывается E_3 [14], необходима для атрофии коркового вещества тимуса [10], можно говорить о решающей роли гормона в данном процессе при беременности.

Выводы

Таким образом, в присутствии антигенной нагрузки E_3 в концентрации, характерной для конца беременности, меняет свой эффект на противоположный, защищая организм матери от потенциальной опасности. Так, гормон усиливает образование iNKT и угнетает формирование nTreg из тимоцитов. При этом E_3 негативно регулирует пролиферативную способность тимических Th17-клеток, компенсируя снижение количества nTreg и предотвращая возможность преждевременных родов.

Благодарности

Авторы выражают глубокую благодарность Наталье Павловне Логиновой и Роману Маратовичу Шехмаматьеву за помощь в работе с клиническими образцами.

Список литературы / References

1. Ширшев С.В., Орлова Е.Г., Заморина С.А., Некрасова И.В. Гормональная регуляция тимического этапа дифференцировки инвариантных NKT-клеток // Доклады академии наук, 2012. Т. 446, № 5. С. 587-589. [Shirshov S.V., Orlova E.G., Zamorina S.A., Nekrasova I.V. Hormonal regulation of the thymic stage of differentiation of invariant NKT cells. *Doklady akademii nauk = Reports of the Academy of Sciences*, 2012, Vol. 446, no. 5, pp. 587-589. (In Russ.)].
2. Ширшев С.В., Орлова Е.Г., Заморина С.А., Некрасова И.В. Гормональная регуляция тимического этапа дифференцировки IL-17-продуцирующих и Т-регуляторных лимфоцитов // Доклады академии наук, 2014. Т. 454, № 1. С. 103-106. [Shirshov S.V., Orlova E.G., Zamorina S.A., Nekrasova I.V. Hormonal regulation of thymic-stage differentiation of IL-17-producing and T-regulatory lymphocytes. *Doklady akademii nauk = Reports of the Academy of Sciences*, 2014, Vol. 454, no. 1, pp. 103-106. (In Russ.)].
3. Ширшев С.В., Орлова Е.Г., Заморина С.А., Некрасова И.В. Гормональная регуляция апоптоза и пролиферации тимоцитов // Вестник уральской медицинской академической науки, 2014. Т. 3, № 49. С. 49-50. [Shirshov S.V., Orlova E.G., Zamorina S.A., Nekrasova I.V. Hormonal regulation of thymocytes apoptosis and proliferation. *Vestnik uralskoy meditsinskoy akademicheskoy nauki = Bulletin of Ural Medical Academic Science*, 2014, Vol. 3, no. 49, pp. 49-50. (In Russ.)].
4. Aronica S.M., Kraus W.L., Katzenellenbogen B.S. Estrogen action via the cAMP signaling pathway: stimulation of adenylate cyclase and cAMP-regulated gene transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994, Vol. 91, no. 18, pp. 8517-8521.
5. Bendelac A., Savage P.B., Teyton L. The biology of NKT cells. *Annu. Rev. Immunol.*, 2007, Vol. 25, pp. 297-336.
6. Bodor J., Fehervari Z., Diamond B., Sakaguchi S. Regulatory T cell-mediated suppression: potential role of ICER. *J. Leukoc. Biol.*, 2007, Vol. 81, no. 1, pp. 161-167.
7. Bryn T., Yaqub S., Mahic M., Henjum K., Aandahl E.M., Taskén K. LPS-activated monocytes suppress T-cell immune responses and induce FOXP3⁺ T cells through a COX-2-PGE2-dependent mechanism. *Int. Immunol.*, 2008, Vol. 20, no. 2, pp. 235-245.
8. Cosmi L., De Palma R., Santarlasci V., Maggi E., Capone M., Frosali F., Rodolico G., Querci V., Abbate G., Angeli R., Berrino L., Fambrini M., Caproni M., Tonelli F., Lazzeri E., Parronchi P., Liotta F., Maggi E., Romagnani S., Annunziato F. Human interleukin 17-producing cells originate from a CD161⁺CD4⁺ T cell precursor. *J. Exp. Med.*, 2008, Vol. 205, no. 8, pp. 1903-1916.
9. de Oliveira L., Larocca R., Sass N., Câmara N.O. Proportion of invariant NKT cells in normal pregnant women at term: an evaluation in peripheral blood, placenta and umbilical cord blood. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 2011, Vol. 65, no. 1, pp. 11-12.
10. Erlandsson M.C., Ohlsson C., Gustafsson J.A., Carlsten H. Role of oestrogen receptors alpha and beta in immune organ development and in oestrogen-mediated effects on thymus. *Immunology*, 2001, Vol. 103, no. 1, pp. 17-25.
11. Ichiyama K., Yoshida H., Wakabayashi Y., Chinen T., Saeki K., Nakaya M., Takaesu G., Hori S., Yoshimura A., Kobayashi T. Foxp3 inhibits RORgammat-mediated IL-17A mRNA transcription through direct interaction with RORgammat. *J. Biol. Chem.*, 2008, Vol. 283, no. 25, pp. 17003-17008.

12. Laan M., Haljasorg U., Kisand K., Salumets A., Peterson P. Pregnancy-induced thymic involution is associated with suppression of chemokines essential for T-lymphoid progenitor homing. *Eur. J. Immunol.*, 2016, Vol. 46, no. 8, pp. 2008-2017.
13. Nekrasova I., Shirshov S. Estradiol in regulation of cell-mediated immune reactions in multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.*, 2020, Vol. 349, 577421. doi: 10.1016/j.jneuroim.2020.577421
14. Rich R.L., Hoth L.R., Geoghegan K.F., Brown T.A., LeMotte P.K., Simons S.P., Hensley P., Myszkowski D.G. Kinetic analysis of estrogen receptor/ligand interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002, Vol. 99, no. 13, pp. 8562-8567.
15. Saito S., Nakashima A., Shima T., Ito M. Th1/Th2/Th17 and regulatory T-cell paradigm in pregnancy. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 2010, Vol. 63, no. 6, pp. 601-610.

Авторы:

Некрасова И.В. — к.б.н., научный сотрудник лаборатории иммунорегуляции Института экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук — филиала ФГБУН «Пермский федеральный исследовательский центр» Уральского отделения Российской академии наук, г. Пермь, Россия

Логинова О.А. — к.б.н., младший научный сотрудник лаборатории иммунорегуляции Института экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук — филиала ФГБУН «Пермский федеральный исследовательский центр» Уральского отделения Российской академии наук, г. Пермь, Россия

Орлова Е.Г. — д.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории иммунорегуляции Института экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук — филиала ФГБУН «Пермский федеральный исследовательский центр» Уральского отделения Российской академии наук, г. Пермь, Россия

Authors:

Nekrasova I.V., PhD (Biology), Researcher, Laboratory of Immunoregulation, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Perm Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation

Loginova O.A., PhD (Biology), Junior Researcher, Laboratory of Immunoregulation, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Perm Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation

Orlova E.G., PhD, MD (Biology), Leading Researcher, Laboratory of Immunoregulation, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Perm Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation

Поступила 29.03.2025
Отправлена на доработку 18.04.2025
Принята к печати 25.05.2025

Received 29.03.2025
Revision received 18.04.2025
Accepted 25.05.2025

КУЛЬТУРА МОНОЦИТОВ КАК МОДЕЛЬ ДЛЯ ТЕСТИРОВАНИЯ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ КОМПОЗИЦИЙ *IN VITRO*

Николенко М.В., Костоломова Е.Г., Сивкова Д.С., Борисенко А.И.,
Барышникова Н.В., Малишевская О.И., Васева Е.М.,
Приходько Ю.С.

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

Резюме. Целью исследования являлось изучение иммуотропных эффектов фармацевтической композиции на основе метаболитов пробиотического штамма и растительных компонентов различного происхождения на моноциты человека *in vitro*. Авторами предложен экзометаболит *Saccharomyces boulardii* (*S. boulardii*) как основа всех предлагаемых составов для регенерации эпителиоцитов человека. В состав смесей входили экстракт зверобоя и масло кориандра. Эффективность полученных фармацевтических средств оценивали на моноцитах взрослого человека. Мононуклеарные клетки (МНК) выделяли методом градиентного центрифугирования. Моноциты высевали в 24-луночные планшеты, сокультивировали с исследуемыми композициями (опыт) и без добавления композиций (контроль). Для идентификации поверхностных маркеров линии моноцитов/макрофагов использовались моноклональные антитела. Фенотипический анализ моноцитов проводили с помощью проточного цитофлуориметра CytoFLEX. Характеристика фенотипа M2 проводилась с использованием антител CD204, CD163 и CD206, тогда как фенотип M1 исследовался с использованием антител CD80 и CD86. Экспериментально доказано, что сокультивирование с экстрактом зверобоя индуцировало культивируемые моноциты к приобретению фенотипа M1, при этом наблюдалось достоверное повышение экспрессии всех поверхностных маркеров для TLR4 CD80 и CD86. Экспрессию маркеров фенотипа M2 по сравнению с нестимулированными клетками, экстракт кориандра напротив, достоверно подавлял. Процентное соотношение моноцитов M2-фенотипа CD204⁺, CD206⁺, CD163⁺ было увеличено после совместного культивирования как с маслом, так и после сокультивирования с метаболитами *S. boulardii* для всех исследуемых маркеров. Воздействие масла кориандра, так и смеси №1 значительно снизило экспрессию генов всех маркеров M1: TLR4, CD80, CD86. Понижающий эффект экспрессии маркеров M1 сохранялся после добавления метаболитов *S. boulardii* только для TLR4

Адрес для переписки:

Николенко Марина Викторовна
ФГБОУ ВО «Тюменский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ
625023, Россия, г. Тюмень, ул. Одесская, 54.
Тел.: 8 (3452) 69-07-82.
E-mail: nikolenko-marina@mail.ru

Address for correspondence:

Marina V. Nikolenko
Tyumen State Medical University
54 Odesskaya St
Tyumen
625023 Russian Federation
Phone: +7 (3452) 69-07-82.
E-mail: nikolenko-marina@mail.ru

Образец цитирования:

М.В. Николенко, Е.Г. Костоломова, Д.С. Сивкова,
А.И. Борисенко, Н.В. Барышникова,
О.И. Малишевская, Е.М. Васева, Ю.С. Приходько
«Культура моноцитов как модель для тестирования
фармацевтических композиций *in vitro*» // Российский
иммунологический журнал, 2025. Т. 28, № 3. С. 393-398.
doi: 10.46235/1028-7221-17170-MCA

© Николенко М.В. и соавт., 2025
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

M.V. Nikolenko, E.G. Kostolomova, D.S. Sivkova,
A.I. Borisenok, N.V. Baryshnikova, O.I. Malishevskaya,
E.M. Vaseva, Yu.S. Prihodko "Monocyte culture as a model
for *in vitro* testing of pharmaceutical compositions", Russian
Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii
Zhurnal, 2025, Vol. 28, no. 3, pp. 393-398.
doi: 10.46235/1028-7221-17170-MCA

© Nikolenko M.V. et al., 2025
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.46235/1028-7221-17170-MCA

и CD 86 по сравнению с контролем. Субпопуляция моноцитов фенотипа TLR4⁺, CD204⁺, CD206⁺, CD163⁺, коэкспрессирующие маркеры поляризации M1 и M2 выявлены при сокультивировании со смесями как 2, так и 3. Процент гибридных TLR4⁺M2-моноцитов был значительно выше в смеси 2 по сравнению со смесью 3 ($p < 0,001$ и $p < 0,05$ соответственно). Таким образом, различные исследуемые смеси вызывают поляризацию моноцитов в M1/M2 в зависимости от состава композиции, что позволяет рекомендовать к использованию в косметологии и, возможно, лечебной практике в зависимости от этиологии заболевания.

Ключевые слова: моноциты, метаболиты, экстракт зверобоя, масло кориандра, интерлейкины, цитокины

MONOCYTE CULTURE AS A MODEL FOR *IN VITRO* TESTING OF PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS

Nikolenko M.V., Kostolomova E.G., Sivkova D.S., Borisenok A.I.,
Baryshnikova N.V., Malishevskaya O.I., Vaseva E.M., Prihodko Yu.S.

Tyumen State Medical University, Tyumen, Russian Federation

Abstract. This study aimed to investigate the immunotropic effects of a pharmaceutical composition based on a probiotic strain metabolites, and plant components of various origin using an *in vitro* model of human monocyte culture. The authors propose a mixture of exometabolites from *Saccharomyces boulardii* (*S. boulardii*) as the basis of all suggested formulations aimed at regeneration of human epithelial cells. The compositions included St. John's wort extract and coriander oil. The effectiveness of these pharmaceutical compositions was evaluated using monocytes isolated from adult donors. Mononuclear cells (MNCs) were isolated by gradient centrifugation. The monocytes were seeded into 24-well plates, co-cultured with the studied compositions (experimental samples) and without compositions (controls). Monoclonal antibodies were used to identify cell markers of monocyte/macrophage lineage. Phenotypic analysis of monocytes was performed using a CytoFLEX flow cytometer. The M2 phenotype was characterized using CD204, CD163, and CD206 antibodies, whereas the M1 phenotype was assessed using CD80 and CD86 antibodies. It was proven that co-cultivation with St. John's wort extract induced cultured monocytes to acquire the M1 phenotype, while a significantly increased expression of all surface markers for TLR4, CD80, and CD86 was observed. In contrast, the coriander extract (mixture #1) significantly inhibited the expression of M2 phenotype markers compared with unstimulated cells. The percentage of M2 monocytes (CD204⁺, CD206⁺, and CD163⁺ phenotypes) was increased after co-cultivation with both oil and after co-cultivation with *S. boulardii* metabolites for all the studied markers. Exposure to coriander oil and mixture No. 1 significantly reduced the gene expression of all M1 markers, i.e. TLR4, CD80, CD86. The reducing effect of M1 marker expression persisted after addition of *S. boulardii* metabolites only for TLR4 and CD86 compared with the control. A subpopulation of monocytes with TLR4⁺, CD204⁺, CD206⁺, CD163⁺ phenotype, coexpressing the M1 and M2 polarization markers was detected during co-cultivation with both mixtures #2 and #3. The percentage of hybrid TLR4⁺M2 monocytes was significantly higher in mixture 2 compared with mixture 3 ($p < 0.001$ and $p < 0.05$, respectively). Hence, the mixtures under study cause M1/M2 monocyte polarization depending on the composition, thus recommending its potential usage in cosmetology and medical practice, depending on etiology of the disease.

Keywords: monocytes, metabolites, St. John's wort extract, coriander oil, interleukins, cytokines

Введение

Возможность использования краткосрочной культуры моноцитов, фибробластов, полиморфноядерных лейкоцитов, выделенных из периферической донорской крови, для оценки биологической активности различных типов

биоразлагаемых полимерных частиц, волокнистых и пленочных субстратов микро- и наноразмеров, фуллеренов, различных фармацевтических композиций потенциально разрабатывается в настоящее время. Бесклеточные супернатанты микроорганизмов обладают широким спектром

разнообразных иммунологических эффектов. В литературе имеются сообщения о том, что метаболиты пробиотических штаммов обладают как противовоспалительными, так и провоспалительными свойствами [1].

Моноциты представляют собой пластичные клетки, способные переключать свой фенотип в ответ на стимулы и сигналы микроокружения [6]. На основании экспрессии маркеров клеточной поверхности, продукции специфических цитокинов и биологической активности клеток было описано две основные субпопуляции моноцитов: классически активированные или воспалительные М1 и альтернативно активированные или противовоспалительные М2. Парадигма М1/М2 возникла аналогично парадигме Th1/Th2, описанной ранее для Т-хелперов в зависимости от участия в различных типах иммунного ответа [4].

Цель исследования — изучить иммунотропные эффекты фармацевтической композиции на основе метаболитов пробиотического штамма и растительных компонентов различного происхождения на моноциты человека *in vitro*.

Материалы и методы

Фармацевтические композиции содержали метаболит, полученный из дрожжей *Saccharomyces boulardii* (*S. boulardii*) по методике Перуновой Н.Б. с соавт. [2011]. Культивирование *S. boulardii* проводилось на бульоне Шедлера при 37 °С в течение 24 часов. Стерильность супернатантов проверяли путем посева на 5% кровяной агар с последующим инкубированием при 37 °С в течение 24 ч. Полученный экзометаболит *S. boulardii* являлся основой всех предлагаемых составов для регенерации эпителиоцитов человека. В композицию № 1 добавляли 7% масла кориандра от общего объема. Фармацевтическая композиция № 2 содержала 0,7 мл экстракта травы зверобоя продырявленного. Вариант № 3 содержал сочетанное произведение масла кориандра и травы зверобоя продырявленного. Отдельно исследовали стерильные бесклеточные супернатанты *S. boulardii*, масло кориандра и экстракт травы зверобоя. Эффективность полученных фармацевтических средств оценивали на моноцитах взрослого человека.

В исследование были включены 6 человек условно здоровых лиц без острой соматической патологии на момент обследования, (3 мужчин и 3 женщин, средний возраст 34±14 лет). Исследования выполнялись в день забора крови. Мононуклеарные клетки (МНК) выделяли методом градиентного центрифугирования (400 g)

в градиенте плотности фиколл-верографин (Pharmacia, Швеция) $\rho = 1,077 \text{ г/см}^3$. Оценку иммуномодулирующей активности фармацевтических композиций проводили на модели клеток врожденного и адаптивного иммунитета в эксперименте *in vitro* [2]. Моноцитарную фракцию получали, используя способность клеток моноцитарно-макрофагального ряда прилипать к стеклу и пластику. Для этого суспензию МНК в концентрации 2×10^6 кл/мл культивируют в полной культуральной среде RPMI-1640 с добавлением 10% инаktivированной эмбриональной телячьей сыворотки (Sigma-Aldrich, США) и 80 мкг/мл гентамицина, в CO₂ инкубаторе при 37 °С в атмосфере 5% CO₂. Через 40 мин собирали не прилипающие клетки, а прилипающие клетки (моноциты) снимали со дна чашки охлажденным (4–6 °С) раствором Версена, который заливали по 1 мл в чашку сразу после удаления надосадочной жидкости. Через 1–2 мин собирали моноциты, помещали в силиконизированные центрифужные пробирки. Центрифугировали при 200 g в течение 10 мин. Удаляли надосадочную жидкость и моноциты ресуспендировали в полной культуральной среде. Моноциты высевали в количестве 1×10^6 в 24-луночные планшеты сокультивировали с исследуемыми композициями (опыт) и без добавления композиций (контроль). Культивировали в полной культуральной среде в CO₂ инкубаторе при 37 °С в атмосфере 5% CO₂ в течение 24 часов. Фенотипический анализ моноцитов проводили с помощью проточного цитофлуориметра CytoFLEX (Beckman Coulter, США). Для этого 100 мкл моноциты инкубировали в течение 30 мин с 10 мкл моноклональных антител. Для идентификации поверхностных маркеров линии моноцитов/макрофагов использовались моноклональные антитела (Beckman Coulter, США) CD14. Характеристика фенотипа М2 проводилась с использованием антител CD204, CD163 и CD206, тогда как фенотип М1 исследовался с использованием антител CD80 и CD86.

Результаты и обсуждение

Макрофаги представляют собой гетерогенную популяцию клеток, играющую важную роль в защитных механизмах и гомеостазе. Макрофаги М1 характеризуются повышенным уровнем экспрессии костимулирующих молекул CD80 и CD86 и толл-подобного рецептора 4 (TLR4). Этот тип макрофагов склонен вырабатывать провоспалительные цитокины, такие как фактор некроза опухоли (TNF) α , интерлейкин (IL)-1 β и IL-6, а также вырабатывать оксид азота (NO) или

реактивные кислородные интермедиаты (ROI) для защиты от патогенов [5]. Напротив, поляризованные макрофаги M2 экспрессируют высокие уровни поверхностных маркеров CD 204, CD 163 и CD 206. А также способствуют выработке противовоспалительных цитокинов, таких как IL-10, трансформирующий фактор роста β (TGF- β), и вырабатывают полиамины и пролин, которые способствуют разрешению воспаления и восстановлению тканей [6].

Экспериментально доказано, что сокультивирование с экстрактом зверобоя индуцировало культивируемые моноциты к приобретению фенотипа M1, при этом наблюдалось достоверное повышение экспрессии всех поверхностных маркеров для TLR4 ($p < 0,05$), а также CD80 и CD86 ($p < 0,01$) по сравнению с нестимулированными клетками. В то же время экстракт зверобоя значительно подавлял экспрессию маркеров фенотипа M2 по сравнению с нестимулированными CD163 и CD206 ($p < 0,01$), CD204 ($p < 0,05$). Процентное соотношение моноцитов M2-фенотипа CD204⁺, CD206⁺, CD163⁺ было значительно увеличено после совместного культивирования как с маслом кориандра по сравнению с контролем ($p < 0,01$; $p < 0,05$; $p < 0,001$ соответственно), так и после сокультивирования с метаболитами *S. boulardii* ($p < 0,01$) для всех исследуемых маркеров. Аналогичный ответ наблюдался при добавлении смеси 1, где одним из компонентов является масло кориандра (CD163, CD204 и CD206 ($p < 0,05$) по сравнению с необработанными). Как воздействие масла кориандра, так и смеси

1 значительно снизило экспрессию генов всех маркеров M1: TLR4, CD80, CD86 ($p < 0,01$ по сравнению с необработанными). Понижающий эффект экспрессии маркеров M1 сохранялся после добавления метаболитов *S. boulardii* только для TLR4 и CD 86 по сравнению с контролем ($p < 0,05$ для обоих маркеров). Моноциты («гибридные» моноциты), коэкспрессирующие маркеры поляризации M1 и M2, наблюдались при сокультивировании со смесями 2, и 3. Процент циркулирующих гибридных TLR4⁺M2 был обнаружен значительно выше в смеси 2 по сравнению со смесью 3 ($p < 0,001$ и $p < 0,05$ соответственно) и с гиперплазией хрящевых клеток (для обеих популяций клеток).

Выводы

Исследуемые смеси вызывают поляризацию моноцитов в M1/M2 в зависимости от состава композиции. В этой связи их можно рекомендовать к использованию в косметологии и, возможно, в лечебной практике, в зависимости от этиологии заболевания и желаемого исхода.

Благодарности

Коллектив авторов выражает благодарность ректору Тюменского ГМУ И.М. Петрову, проректору по научно-исследовательской работе и инновационной политике Е.Б. Храмовой.

Список литературы / References

1. Барышникова Н.В., Васева Е.М., Сивкова Д.С., Борисенок А.И., Малишевская О.И., Приходько Ю.С., Николенко М.В. Влияние композиционного состава на основе экзометаболитов *Saccharomyces boulardii* в отношении патогенных и персистентных свойств грибов рода *Candida* // Российский иммунологический журнал, 2024. Т. 27, № 3. С. 493-498. [Baryshnikova N.V., Vaseva E.M., Sivkova D.S., Borisenok A.I., Malishevskaya O.I., Prikhodko Yu.S., Nikolenko M.V. The influence of a composition based on exometabolites of *Saccharomyces boulardii* in relation to the pathogenic and persistent properties of fungi of the genus *Candida*. *Rossiyskiy immunologicheskii zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2024, Vol. 27, no. 3, pp. 493-498. (In Russ.)] doi: 10.46235/1028-7221-16693-TIO.
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.Kh., 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 immunologicheskii zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2022, Vol. 25, no. 2, pp. 213-218. (In Russ.)] doi: 10.46235/1028-7221-1133-IVE.
3. Rath M., Müller I., Kropf P., Closs E.I., Munder M. Metabolism via arginase or nitric oxide synthase: two competing arginine pathways in macrophages. *Front. Immunol.*, 2014. Vol. 5, 532. doi: 10.3389/fimmu.2014.00532.

4. Tuzlak S., Dejean A.S., Iannacone M., Quintana F.J., Waisman A., Ginhoux F., Korn T., Becher B. Repositioning T_H cell polarization from single cytokines to complex help. *Nat. Immunol.*, 2021, Vol. 22, no. 10, pp. 1210-1217.
5. Fernando M.R., Reyes J.L., Iannuzzi J., Leung G., McKay D.M. The Pro-Inflammatory Cytokine, Interleukin-6, Enhances the Polarization of Alternatively Activated Macrophages. *PloS One*, 2014, Vol. 9, no. 4, e94188. doi: 10.1371/journal.pone.0094188.
6. Yang J., Zhang L., Yu C., Yang X.F., Wang H. Monocyte and macrophage differentiation: circulation inflammatory monocyte as biomarker for inflammatory diseases. *Biomarker Res.*, 2014, Vol. 2, no. 1, 1. doi: 10.1186/2050-7771-2-1.

Авторы:

Николенко М.В. — д.б.н., профессор кафедры микробиологии, заведующая лабораторией микробиома, регенеративной медицины и клеточных технологий ФГБОУ ВО «Тюменский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Тюмень, Россия

Костоломова Е.Г. — к.б.н., доцент кафедры микробиологии ФГБОУ ВО «Тюменский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Тюмень, Россия

Сивкова Д.С. — ассистент кафедры микробиологии, младший научный сотрудник лаборатории микробиома, регенеративной медицины и клеточных технологий ФГБОУ ВО «Тюменский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Тюмень, Россия

Борисенок А.И. — к.фарм.н., доцент кафедры микробиологии ФГБОУ ВО «Тюменский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Тюмень, Россия

Authors:

Nikolenko M.V., PhD, MD (Biology), Professor of the Department of Microbiology, Head of the Laboratory of Microbiome, Regenerative Medicine and Cellular Technologies, Tyumen State Medical University, Tyumen, Russian Federation

Kostolomova E.G., PhD (Biology), Associate Professor, Department of Microbiology, Tyumen State Medical University, Tyumen, Russian Federation

Sivkova D.S., Assistant Professor of the Department of Microbiology, Junior Researcher of the Laboratory of Microbiome, Regenerative Medicine and Cellular Technologies, Tyumen State Medical University, Tyumen, Russian Federation

Borisenok A.I., PhD (Pharmacy), Associate Professor, Department of Microbiology, Tyumen State Medical University, Tyumen, Russian Federation

Барышникова Н.В. — старший преподаватель кафедры микробиологии ФГБОУ ВО «Тюменский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Тюмень, Россия

Малишевская О.И. — к.фарм.н., доцент кафедры фармацевтических дисциплин ФГБОУ ВО «Тюменский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Тюмень, Россия

Васева Е.М. — к.фарм.н., доцент кафедры фармацевтических дисциплин ФГБОУ ВО «Тюменский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Тюмень, Россия

Приходько Ю.С. — ассистент кафедры фармацевтических дисциплин ФГБОУ ВО «Тюменский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Тюмень, Россия

Baryshnikova N.V., Senior Lecturer, Department of Microbiology, Tyumen State Medical University, Tyumen, Russian Federation

Malishevskaya O.I., PhD (Pharmacy), Associate Professor, Department of Pharmaceutical Disciplines, Tyumen State Medical University, Tyumen, Russian Federation

Vaseva E.M., PhD (Pharmacy), Associate Professor, Department of Pharmaceutical Disciplines, Tyumen State Medical University, Tyumen, Russian Federation

Prikhodko Yu.S., Assistant Professor, Department of Pharmaceutical Disciplines, Tyumen State Medical University, Tyumen, Russian Federation

Поступила 29.03.2025
Отправлена на доработку 09.04.2025
Принята к печати 25.05.2025

Received 29.03.2025
Revision received 09.04.2025
Accepted 25.05.2025

ИММУНОФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ОЦЕНКИ НОВОГО БИОСОЕДИНЕНИЯ

Забокрицкий Н.А.

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

Резюме. Тематика заявленной публикации посвящена весьма актуальным вопросам в области иммунофармакологии по созданию новых биосоединений из группы пробиотиков и продуцируемых ими биологически активных веществ, а именно разработке нового гепатопротекторного фармакологического лекарственного средства с иммуномодулирующим действием. На сегодняшний день в области современной фармакологии и биотехнологии микроорганизмы сенной палочки являются перспективными и востребованными продуцентами для получения нового класса биосоединений — метабитиков. Одним из ключевых преимуществ является отсутствие в их составе клеток, что позволяет существенно снизить иммунную нагрузку на макроорганизм с сохранением функционально-биологического потенциала. При этом весьма актуальными и далеко нерешенными остаются вопросы разработки, создания и конструирования медицинских иммунобиологических препаратов метабитиков для применения в фармацевтической, медицинской и биотехнологической сферах. В работе использовали метаболиты, синтезируемые сенной палочкой, а именно штаммами *Bacillus subtilis* В-23хх, В-99хх1 и В-99хх2. В наших ранее проведенных исследованиях была показана безопасность и установлен существенный гепатопротективный эффект вышеуказанных штаммов, которые могут быть успешно использованы для конструирования современных гепатопиктов с гепатозащитными свойствами. При этом весьма актуальным остается неисследованная возможность системного иммуностропного действия этих метабитических соединений. Важно отметить, что одновременное применение трех комплексов биологически активных веществ позволит обеспечить значимый потенцирующий иммуностропный фармакологический эффект. Цель исследования — на модели острого токсического гепатита у лабораторных животных экспериментально изучить иммуностропное действие нового биосоединения на показатели клеточного иммунитета. Острое токсическое поражение печени воспроизводили на белых лабораторных крысах посредством разового перорального введения гепатотропного яда — четыреххлористого углерода. Новое биосоединение в виде суспензии вводили внутривентрикулярно. В эксперименте давали оценку таким показателям, как количественное определение лимфоцитов и антителообразующих клеток, определение фагоцитарной активности и метаболической активности нейтрофилов периферической крови. В результате выполненных исследований

Адрес для переписки:

Забокрицкий Николай Александрович
ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии»
Уральского отделения Российской академии наук
620049, Россия, г. Екатеринбург, ул. Первомайская, 106.
Тел.: 8 (343) 374-00-70.
E-mail: pharmusma@rambler.ru

Address for correspondence:

Nikolai A. Zabokritskiy
Institute of Immunology and Physiology,
Ural Branch, Russian Academy of Sciences
106 Pervomayskaya St
Ekaterinburg
620049 Russian Federation
Phone: +7 (343) 374-00-70.
E-mail: pharmusma@rambler.ru

Образец цитирования:

Н.А. Забокритский «Имунофармакологические аспекты экспериментальной оценки нового биосоединения» // Российский иммунологический журнал, 2025. Т. 28, № 3. С. 399-402.
doi: 10.46235/1028-7221-17131-IAO

© Забокритский Н.А., 2025

Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

N.A. Zabokritskiy "Immunopharmacological aspects of experimental evaluation of the new biocompound", Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2025, Vol. 28, no. 3, pp. 399-402.
doi: 10.46235/1028-7221-17131-IAO

© Zabokritskiy N.A., 2025

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

DOI: 10.46235/1028-7221-17131-IAO

установлено, что предлагаемые гепатопротекторные биосоединения обладают иммуномодулирующим действием.

Ключевые слова: пробиотик, бациллы, острый токсический гепатит, биологически активные вещества, клеточный иммунитет, гепатопикты, гепатопротекторы

IMMUNOPHARMACOLOGICAL ASPECTS OF EXPERIMENTAL EVALUATION OF THE NEW BIOCOMPOUND

Zabokritskiy N.A.

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

Abstract. The publication is devoted to very topical issues in the field of immunopharmacology on the creation of new bio compounds from the group of probiotics and biologically active substances produced by them, namely, the development of a new hepatoprotective pharmacological drug with an immunomodulatory effect. Today, in the field of modern pharmacology and biotechnology, microorganisms of the hay bacillus are promising and in-demand producers for obtaining a new class of bio compounds — metabiotics. One of the key advantages is the absence of cells in their composition, which significantly reduces the immune burden on the macroorganism while maintaining its functional and biological potential. At the same time, the issues of the development, creation and construction of medical immunobiological preparations of metabiotics for use in the pharmaceutical, medical and biotechnological fields remain very relevant and far unresolved. The metabolites synthesized by hay bacillus, namely *Bacillus subtilis* strains B-23xx, B-99xx1 and B-99xx2, were used in the work. In our earlier studies, the safety was demonstrated and a significant hepatoprotective effect of the above strains was established, which can be successfully used to construct modern hepatopicts with hepatoprotective properties. At the same time, the unexplored possibility of systemic immunotropic action of these metabiotic compounds remains very relevant. It is important to note that the simultaneous use of three complexes of biologically active substances will provide a significant potentiating immunotropic pharmacological effect. The aim of the study was to experimentally study the immunotropic effect of a new bio compound on cellular immunity using a model of acute toxic hepatitis in laboratory animals. Acute toxic liver damage was reproduced in white laboratory rats by single oral administration of a hepatotropic poison, carbon tetrachloride. The new bio compound was administered intragastrically in the form of a suspension. In the experiment, such indicators as quantitative determination of lymphocytes and antibody-forming cells, determination of phagocytic activity and metabolic activity of peripheral blood neutrophils were evaluated. As a result of the performed studies, it was found that the proposed hepatoprotective bio compounds also have an immunomodulatory effect.

Keywords: probiotic, bacilli, acute toxic hepatitis, biologically active substances, cellular immunity, hepatopicts, hepatoprotectors

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

Введение

Медицинские иммунобиологические препараты — новый фармакологический класс лекарственных средств, наиболее многочисленную группу которых составляют синбиотики, эубиотики, пробиотики, пребиотики и метабиотики [1, 3, 5, 8]. В последние годы все больше внимания уделяются последнему поколению пробиотиков, получаемых из метаболитов. Известно, что биологически активные вещества микробиологического происхождения обладают функционально-биологическим потенциалом и могут

являться основой для получения новых фармакологически активных препаратов гепатопротекторов с иммуномодулирующим эффектом [2, 4]. При этом отсутствие в их составе клеток позволяет существенно снизить иммунную нагрузку на макроорганизм с сохранением функционально-биологического потенциала. В наших ранее проведенных исследованиях были показана безопасность и установлен существенный гепатопротективный эффект вышеуказанных штаммов, которые могут быть успешно использованы для конструирования современных гепатопиктов с гепатозащитными свойствами [2, 5, 6]. При этом весьма актуальным остается неисследованная возможность системного иммуностропного дей-

ствия этих метабиотических соединений. Важно отметить, что одновременное применение трех комплексов биологически активных веществ позволит обеспечить значимый потенцирующий иммунотропный фармакологический эффект.

Цель исследования — дать экспериментальную оценку иммуномодулирующим свойствам новых биосоединений.

Материалы и методы

Биологически активные вещества биосоединений получали в соответствии с общепринятыми в научной литературе методам [7]. Используя ВЭЖХ определяли качественный и количественный состав метабиотиков: протеиново-полисахаридный комплекс 0,22-0,34 мкг/мл; свободные аминокислоты и протеины 0,12-2,1 мкг/мл; пуриновые основания и пиримидиновые основания (аденин 0,22-0,24 мкг/мл; тимин 0,004-0,007 мкг/мл; гуанин 0,004-0,005 мкг/мл; урацил 0,016-0,017 мкг/мл), гексозамин 0,045-0,058 мкг/мл; соединения витаминов: рибофлавин 0,024 мкг/мл; тиамин 0,006 мкг/мл; пиридоксин 0,002 мкг/мл; антибиотические вещества 0,12-0,53%; прочие соединения < 4%. Объектами исследований были метаболиты микроорганизмов рода *Bacillus subtilis*, штаммы В-23хх, В-99хх1 и В-99хх2.

Модель острого печеночного повреждения осуществляли внутригастрально однократно 50% CCl_4 и воспроизводили на половозрелых беспородных крысах из расчета 0,1 г на 1 килограмм массы тела). Метаболиты вводили интрагастрально в течение 10 дней с момента формирования острого токсического гепатита. Наблюдение за животными осуществляли в течение 28 суток.

В дизайне настоящего исследования было задействовано 36 белых лабораторных беспородных крыс по 6 животных в группе:

I — биологически активные соединения микроорганизмов рода *Bacillus subtilis*, штаммы В-23хх, В-99хх1 и В-99хх2;

II — биологически активные соединения микроорганизмов рода *Bacillus subtilis*, штаммы В-23хх и В-99хх1;

III — биологически активные соединения микроорганизмов рода *Bacillus subtilis*, штаммы В-23хх и В-99хх2;

IV — препарат сравнения (урсодезоксихолевая кислота);

V — контрольная группа (без лечения);

VI — контрольная группа (интактные).

В эксперименте давали оценку таким показателям, как количественное определение лимфоцитов и антителообразующих клеток, определение фагоцитарной активности и мета-

болической активности нейтрофилов периферической крови.

Обработку результатов выполняли с использованием параметрического F-критерия, непараметрического W-критерия при уровне значимости $p < 0,05$. Нормальность распределения определяли методом Колмогорова—Смирнова.

Результаты и обсуждение

В результате выполненного эксперимента достоверно установлена иммунотропная активность всех исследуемых биосоединений. Так, в условиях воспроизведенной модели острого токсического повреждения печени регистрировали повышение всех факторов клеточного иммунитета. Прежде всего отмечали увеличение всех исследуемых факторов у V группы по сравнению с группой VI. Повышение фагоцитарной активности нейтрофилов составило 4,2 раза, достигнув $65,4 \pm 0,41$ опт. ед., а их способность поглощать нитросиним тетразолий увеличилась в 1,9-кратном масштабе. Также было выявлено увеличение численности Т- и В-лимфоцитов: в 2,8 раза до $0,81 \pm 0,24 \times 10^6 \times \text{см}^{-3}$ и $0,69 \pm 0,12 \times 10^6 \times \text{см}^{-3}$ соответственно. Количество клеток, продуцирующих антитела, также возросло в 2,5 раза, достигнув $0,168 \pm 0,033 \times 10^6 \times \text{см}^{-3}$.

Фагоцитарную активность нейтрофилов (ФАН) оценивали в динамике, в течение шести дней, которая в первых трех группах возрастала кратно в 8,1, 5,8 и 4,9 раз соответственно. При этом стоит отметить, что все это сопровождалось 5,3, 4,1 и 3,0-кратным увеличением количества Т- и В-лимфоцитов. Динамика увеличения количества этих клеток была на 12-14-е сутки эксперимента с возвращением показателей к исходным значениям на 28-е сутки. Причем более выраженные значения (в 3,2) раза были в группе, получавшей биологически активные соединения штаммов В-23хх, В-99хх1 и В-99хх2 по сравнению с остальными экспериментальными группами, и в 4,1 раза больше, по сравнению с группой контроля (урсодезоксихолевая кислота). Одновременно регистрировали изменение АОК, а именно повышение в 2,3 раза в группах I-III. Стоит отметить, что по истечению 14 дней эксперимента, ФАН и их поглотительная активность не возрастала, а имела тенденцию в иммуномодуляции до завершения всего срока эксперимента.

Выводы

Разработанное гепатопротекторное соединение стимулирует клеточный иммунитет, что подтверждается результатами проведенных исследований. Одновременное применение трех

комплексов биологически активных веществ позволяет достичь аддитивно-потенцирующий иммуностропный фармакологический эффект.

В результате выполненных исследований установлено, что предлагаемые гепатопротекторные биосоединения обладают иммуномодулиру-

ющим действием. Таким образом, весьма целесообразно рекомендовать разработанные новые биосоединения-метабиотики для создания новых и перспективных и безопасных фармакологических препаратов с иммуномодулирующим эффектами.

Список литературы / References

1. Ардатская М.Д., Столярова Л.Г., Архипова Е.В., Филимонова О.Ю. Метабиотики как естественное развитие пробиотической концепции // Рецепт, 2019. Т. 22, № 2. С. 291-298. [Ardatskaya M.D., Stolyarova L.G., Arkhipova E.V., Filimonova O.Yu. Metabiotics as a natural development of a probiotic concept. *Retsept = Recipe*, 2019, Vol. 22, no. 2, pp. 291-298. (In Russ.)]
2. Забокрицкий Н.А. Оценка иммуностропного действия пробиотика бацилакт в составе трансдермальных терапевтических систем // Российский иммунологический журнал, 2017. Т. 20, № 2. С. 126-129. [Zabokritskiy N.A. Preclinical evaluation of immunotropic action of probiotics bacilact transdermal therapeutic system. *Rossiyskiy immunologicheskii zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2017, 11, Vol. 20, no. 2, pp. 126-129. (In Russ.)]
3. Забокрицкий Н.А. Принципиальные направления научных исследований по обоснованию и разработке новых иммунобиологических препаратов // Экспериментальная и клиническая фармакология, 2018. Т. 81, № 5. С. 85-86. [Zabokritskiy N.A. Principal directions of scientific research on the justification and development of new immunobiological drugs. *Rossiyskiy immunologicheskii zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2018, Vol. 81, no. 5, pp. 85-86. (In Russ.)]
4. Забокрицкий Н.А., Сарапульцев П.А. Экспериментальное обоснование возможности создания нового метаболического препарата // Российский иммунологический журнал, 2018. Т. 12, № 3. С. 295-300. [Zabokritskiy N.A., Sarapultsev P.A. Experimental justification of the possibility of creating the new metabolic drug. *Rossiyskiy immunologicheskii zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2018, Vol. 12, no. 3, pp. 295-300. (In Russ.)]
5. Забокрицкий Н.А. Фармакологическая оценка иммуностропной активности нового гелевого метабиотика на факторы клеточного и гуморального иммунитета при экспериментальном моделировании термических ожогов кожи // Российский иммунологический журнал, 2020. Т. 23, № 2. С. 125-132. [Zabokritskiy N.A. Pharmacological assessment of immunotropic activity of new gel metabiotic on cellular and humoral immunity in experimental modeled thermal skin burns. *Rossiyskiy immunologicheskii zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2020, Vol. 23, no. 2, pp. 125-132. (In Russ.)] doi: 10.46235/1028-7221-314-PAO.
6. Забокрицкий Н.А. Изучение цитопротекторных свойств метаболитов штамма *Bacillus subtilis* B-9909 на культуре выделенных гепатоцитов // Вестник уральской медицинской академической науки, 2022. Т. 19, № 3. С. 203-209. [Zabokritskiy N.A. Experimental evaluation of the cytoprotective effect of probiotic metabolites of *Bacillus subtilis* B-9909 strain on the culture of isolated hepatocytes. *Vestnik uralskoy medicinskoy akademicheskoy nauki = Journal of Ural Medical Academic Science*, 2022, Vol. 19, no. 3, pp. 125-132. (In Russ.)]
7. Лабинская А.С., Блинкова Л.П., Ещина А.С., Булаева Г.В., Вертиев Ю.В., Винокуров А.Е., Горобец О.Б., Дарбеева О.С., Жиленков Е.Л., Зверьков Д.А., Иванова С.М., Иванова Т.С., Корн М.Я., Кривопалова Н.С., Лукин И.Н., Мельникова В.А., Нехорошева А.Г., Романова Ю.М., Сидоренко С.В., Скаженник В.Ю., Скала Л.З., Трухина Г.М. Общая и санитарная микробиология с техникой микробиологических исследований. СПб.: Лань, 2016. 588 с. [Labinskaya A.S., Blinkova L.P., Eshina A.S., Bulaeva G.V., Vertiev Yu.V., Vinokurov A.E., Gorobets O.B., Darbeeva O.S., Zhilenkov E.L., Zverkov D.A., Ivanova S.M., Ivanova T.S., Korn M.Ya., Krivopalova N.S., Lukin I.N., Melnikova V.A., Nekhorosheva A.G., Romanova Yu.M., Sidorenko S.V., Skazenik V.Yu., Skala L.Z., Trukhina G.M. General and Sanitary Microbiology with the Technique of microbiological research]. St. Petersburg: Lan, 2016. 588 p.
8. Lee N.K., Paik H.D., Kim W.S. Bacillus strains as human probiotics: characterization, safety, microbiome, and probiotic carrier. *Food Sci. Biotechnol.*, 2019, Vol. 28, no. 5, pp. 1297-1305.

Автор:

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

Author:

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

Поступила 24.03.2025

Отправлена на доработку 09.05.2025

Принята к печати 25.05.2025

Received 24.03.2025

Revision received 09.05.2025

Accepted 25.05.2025

ОСОБЕННОСТИ СТАРЕНИЯ КРОВИ ЯВАНСКИХ МАКАК

**Сухих А.А.¹, Жукова Д.С.², Карал-оглы Д.Д.², Клоц И.Н.²,
Злобина А.П.², Акулов А.П.¹, Терещенко В.П.¹, Рыбцов С.А.¹**

¹ АНОО ВО «Научно-технологический университет «Сириус», пгт Сириус, Краснодарский край, Россия

² НИЦ «Курчатовский институт», Курчатовский комплекс медицинской приматологии, с. Веселое, Краснодарский край, Россия

Резюме. Исследование старения кроветворной системы у неантропоидных приматов, таких как макака яванская, предоставляет уникальную возможность для понимания эволюционно-консервативных механизмов старения человека и изучения возрастной динамики основных клеточных и биохимических показателей крови. Эти данные могут быть полезны для оценки результатов доклинических исследований на животных различных возрастных групп. Старение иммунной системы сопровождается нарушением функции отдельных клеток и изменением представленности популяций в циркулирующей крови. Несмотря на схожесть количественных показателей, возрастная динамика клеток крови у человека и макаки яванской имеет различия. Целью данного исследования было провести сравнительный анализ возрастных изменений клеточного состава крови и биохимических показателей крови у доноров и макак яванских. В исследования были включены группы животных в возрасте 4-9 лет, а также уникальная группа старых особей в возрасте 18-27 лет. Дополнительно были исследованы образцы крови, полученные от доноров-добровольцев различных возрастных групп (20-30, 31-56 и 57-85 лет). Были проанализированы абсолютные показатели содержания клеток крови у доноров и макак, был проведен биохимический анализ крови у макак разных возрастных групп и проведен сравнительный анализ старения крови человека и макак. В данном исследовании у макак было зафиксировано снижение количества тромбоцитов с возрастом, что указывает на снижение продукции мегакариоцитов и их предшественников в костном мозге. Старение яванских макак также сопровождалось достоверным повышением уровня триглицеридов и глобулинов в крови, а также тенденцией к снижению уровня альбумина, что привело к уменьшению соотношения общего альбумина к глобулинам. Этот показатель у человека связан с общим состоянием здоровья, и его снижение наблюдается с возрастом. У самцов и самок также наблюдается тенденция к повышению уровня глюкозы, билирубина, холестерина и воспалительных ферментов с возрастом. Уровень креатинина был значительно выше у самцов независимо от возраста и превышал уровень этого показателя у самок.

Ключевые слова: макака яванская, периферическая кровь, гематологические показатели, биохимические показатели, старение, гемопоэз

Адрес для переписки:

Сухих Артём Александрович
АНОО ВО «Научно-технологический университет
«Сириус»
354349, Россия, Краснодарский край, пгт Сириус,
Олимпийский пр., 1.
Тел.: 8 (800) 100-41-55 (доб. 4710).
E-mail: suhikh.aa@talantiuspeh.ru

Address for correspondence:

Artjom A. Sukhikh
Sirius University of Science and Technologies
1 Olympic Ave
Sirius settlement, Krasnodar Region
354349 Russian Federation
Phone: +7 (800) 100-41-55 (acc. 4710).
E-mail: suhikh.aa@talantiuspeh.ru

Образец цитирования:

А.А. Сухих, Д.С. Жукова, Д.Д. Карал-оглы, И.Н. Клоц,
А.П. Злобина, А.П. Акулов, В.П. Терещенко,
С.А. Рыбцов «Особенности старения крови яванских
макак» // Российский иммунологический журнал, 2025.
Т. 28, № 3. С. 403-408.
doi: 10.46235/1028-7221-17206-FOB

© Сухих А.А. и соавт., 2025

Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

A.A. Sukhikh, D.S. Zhukova, D.D. Karal-ogly, I.N. Klots,
A.P. Zlobina, A.P. Akulov, V.P. Tereshchenko, S.A. Rybtsov
“Features of blood aging in Macaca fascicularis”, Russian
Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii
Zhurnal, 2025, Vol. 28, no. 3, pp. 403-408.
doi: 10.46235/1028-7221-17206-FOB

© Sukhikh A.A. et al., 2025

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

DOI: 10.46235/1028-7221-17206-FOB

FEATURES OF BLOOD AGING IN *MACACA FASCICULARIS*

Sukhikh A.A.^a, Zhukova D.S.^b, Karal-ogly D.D.^b, Klots I.N.^b,
Zlobina A.P.^b, Akulov A.P.^a, Tereshchenko V.P.^a, Rybtsov S.A.^a

^a Sirius University of Science and Technologies, Sirius settlement, Krasnodar Region, Russian Federation

^b National Research Centre "Kurchatov Institute", Kurchatov Complex of Medical Primatology, Vesyoloye village, Krasnodar Region, Russian Federation

Abstract. The study of hematopoietic system aging in non-anthropoid primates such as the *Cynomolgus macaque* (*Macaca fascicularis*) provides a unique opportunity to understand the evolutionarily conserved mechanisms of human aging and the age-related dynamics of the main cellular and biochemical parameters of peripheral blood. These data are helpful for evaluating the results of preclinical studies on animals of different age groups. Aging of immune system is accompanied by impaired cellular function and changed ratios of cell populations in circulating blood. Despite similarity of quantitative indices, the age-related dynamics of blood cells are different in humans and *Cynomolgus macaque*. The aim of the study was to conduct a comparative analysis of age-related changes in cellular composition of blood and biochemical parameters of blood in *Cynomolgus* macaques and human donors. This study included groups of animals aged 4–9 years, as well as a unique group of old individuals aged 18–27 years. In addition, we analyzed blood samples obtained from volunteer donors of different age groups (20–30, 31–56 and 57–85 years). Absolute blood cell counts in donors and macaques were assessed, biochemical blood analysis was performed in macaques of different age groups, and a comparative analysis of blood aging in humans and macaques was conducted. In this study, macaques showed a decrease in platelet counts with age, indicating a decreased production of megakaryocytes and their precursors in bone marrow. Aging in *Cynomolgus* macaques was also accompanied by a significant increase in triglyceride and globulin levels in the blood, as well as a trend toward a decrease in albumin levels, thus reducing the total albumin/globulin ratio. This index in human donors is associated with overall health, and its decrease is observed with age. In males and females, there is also a trend toward an increase in glucose, bilirubin, cholesterol, and inflammatory enzymes with age. Creatinine levels were significantly higher in males regardless of age and exceeded this indicator in females.

Keywords: *Macaca fascicularis*, peripheral blood, hematological parameters, biochemical parameters, aging, haematopoiesis

Анализ крови макак выполнен по государственному заданию НИЦ «Курчатовский институт». Анализ крови человека, выполнен при поддержке Российского научного фонда (проект №23-15-00443; <https://rscf.ru/project/23-15-00443/>).

Введение

Неантропоидные приматы старого света являются близкими родственниками человека и используются в доклинических исследованиях для моделирования патологических состояний человека и отработки методов лечения. Результаты исследований, полученные на неантропоидных приматах, являются крайней линией проверки лекарственных препаратов до перехода к клиническим испытаниям на человеке. Проведение исследований на лабораторных животных требует получения базовых (фоновых) значений основных клинических параметров, в первую очередь гематологических и биохимических, у животных разных возрастных групп. Опираясь на эти исходные данные, возможно контролировать динамику их изменения в ходе

эксперимента и оценивать последствия применения изучаемых препаратов и методик. В ходе работы были проведены общий анализ крови, биохимический анализ крови и статистическая обработка результатов с целью выявления динамики возрастных и половых различий. В научной литературе достаточно хорошо изучены гематологические и биохимические параметры яванских макак [1, 2, 3, 4]. Однако практически отсутствуют данные по старым животным (более 15 лет). Продолжительность жизни яванского макака наиболее популярного в доклинических исследованиях в неволе составляет около 30 лет. Сравнение групп молодых и старых животных позволяет выявить основные признаки старения гемопоэтической системы. Полученные сравнительные результаты человека и макаки яванской позволяют понять эволюционно-консервативные механизмы старения гемопоэтической системы приматов, найти индикаторы старения и разработать подходы к оценке последствий лекарственных интервенций на здоровье и старение животных.

Материалы и методы

Периферическую кровь отбирали у доноров-добровольцев различных возрастных групп, после получения добровольного информированного согласия, следуя протоколу одобренному комитетом по биоэтике Университета «Сириус» (от 06.03.2023). Также отбирали кровь у яванских макак (*Macaca fascicularis*) из поверхностной бедренной вены согласно одобренному этическому разрешению Курчатовского комплекса медицинской приматологии (№ 02-3пр от 21.03.2024). Анализ гематологических параметров (для доноров-добровольцев и приматов) проводили на гематологическом анализаторе МЕК-7300К, Nihon Kohden, Japan. Анализ биохимических параметров (для приматов) проводили с использованием оборудования центра коллективного пользования «Примат» на анализаторе Biolit-8020.

В исследования были вовлечены две группы животных 4-9 лет и 18-27 лет обоих полов. Все животные были рождены в питомнике ФГБНУ «Научно-исследовательский институт медицинской приматологии» (сейчас — Курчатовский комплекс медицинской приматологии НИЦ «Курчатовский институт»). Во время работы в НИИ медицинской приматологии исследование было одобрено биоэтическим комитетом НИИ медицинской приматологии, протокол № 83 от 18 марта 2022 г.) и проводилось в соответствии с требованиями Международной ассоциации по оценке и аккредитации ухода за лабораторными животными в соответствии с требованиями Европейской Конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или иных целей, ETS № 123 и Директивы № 2010/63/EU, принятой Европейским Парламентом 22 сентября 2010 г. Все макаки, включенные в исследование, были признаны клинически здоровыми на основании регулярных ветеринарных осмотров и тестов на туберкулез и вирус герпеса В, а также в соответствии с предыдущими записями.

Для выявления возрастных изменений в системе крови были проанализированы данные общего анализа 3 возрастных групп условно здоровых доноров: 20-30 лет (медиана — 23 года, 11 женщин, 5 мужчин), 31-56 лет (медиана — 41 год, 3 женщины, 5 мужчин), 57-85 лет (медиана — 61 год, 8 женщин, 4 мужчин); и 2 возрастных групп яванских макак: 4-9 лет (соответствует 13,2-33,3 человеческим годам, медиана — 6 лет, 7 самок, 7 самцов), 18-27 лет (соответствует 57-89 человеческим годам, 3 самки, 3 самца).

Статистическую обработку и визуализацию данных проводили в программе GraphPad Prism с использованием двухфакторного дисперсионного анализа с множественными сравнениями Сидака.

Питание животных

Все животные содержались в питомнике Курчатовского комплекса медицинской приматологии в индивидуальных или семейных клетках при температуре окружающей среды (21-28 °С); относительной влажности 40-70%; естественном световом дне. Санитарные мероприятия проводились в соответствии законодательством Российской Федерации. Доступ к свежей воде для животных обеспечивался через центральное водоснабжение в соответствии с государственными нормами: СанПиН 2.1.3684-21, СанПиН 1.2.3685-21, Роспотребнадзор, Российская Федерация. Периодически проводились анализы проб воды на загрязнение. Рацион животных был сбалансирован по белкам, жирам, витаминам и углеводам. По составу корм содержал пищевые волокна, состоял из полнорационного комбикорма, фруктов, овощей, рисовой каши с изюмом, печенья, брикетированного корма согласно средним нормам потребления кормов. Кормление животных осуществлялось три раза в день: 8:00-9:00 — гранулированный сбалансированный корм; 11:00-12:00 — сочный корм (фрукты, овощи), рисовая каша, печенье; с 14:00 до 15:00 гранулированный сбалансированный корм (согласно местным нормативам: SOP AC 11 Кормление обезьян, содержащихся в индивидуальных клетках).

Результаты и обсуждение

При исследовании данных общего анализа крови условно здоровых доноров и яванских макак выявлено статистически значимое (рис. 1) снижение количества эритроцитов у мужчин возрастной группы 57-85 лет по сравнению с группой 20-30 лет, увеличение моноцитов у женщин возрастной группы 31-57 лет по сравнению с группой 20-30 лет, увеличение гемоглобина у женщин возрастной группы 57-85 лет по сравнению с группой 20-30 лет. Все эти показатели были индивидуальны для человека и схожей тенденции не наблюдалось у яванских макак. У самок макаки яванской выявлено снижение тромбоцитов в группе 18-27 лет по сравнению с группой 4-10 лет.

Однако по общему анализу крови количество форменных элементов крови у яванских макак в целом схоже с таковым у человека, но возрастная динамика не совпадает с таковой у человека (рис. 1). Были выявлены некоторые отличия: так, у макак больше лейкоцитов и лимфоцитов и меньше моноцитов, нейтрофилов и эозинофилов. У обоих видов наблюдается половой диморфизм показателей крови.

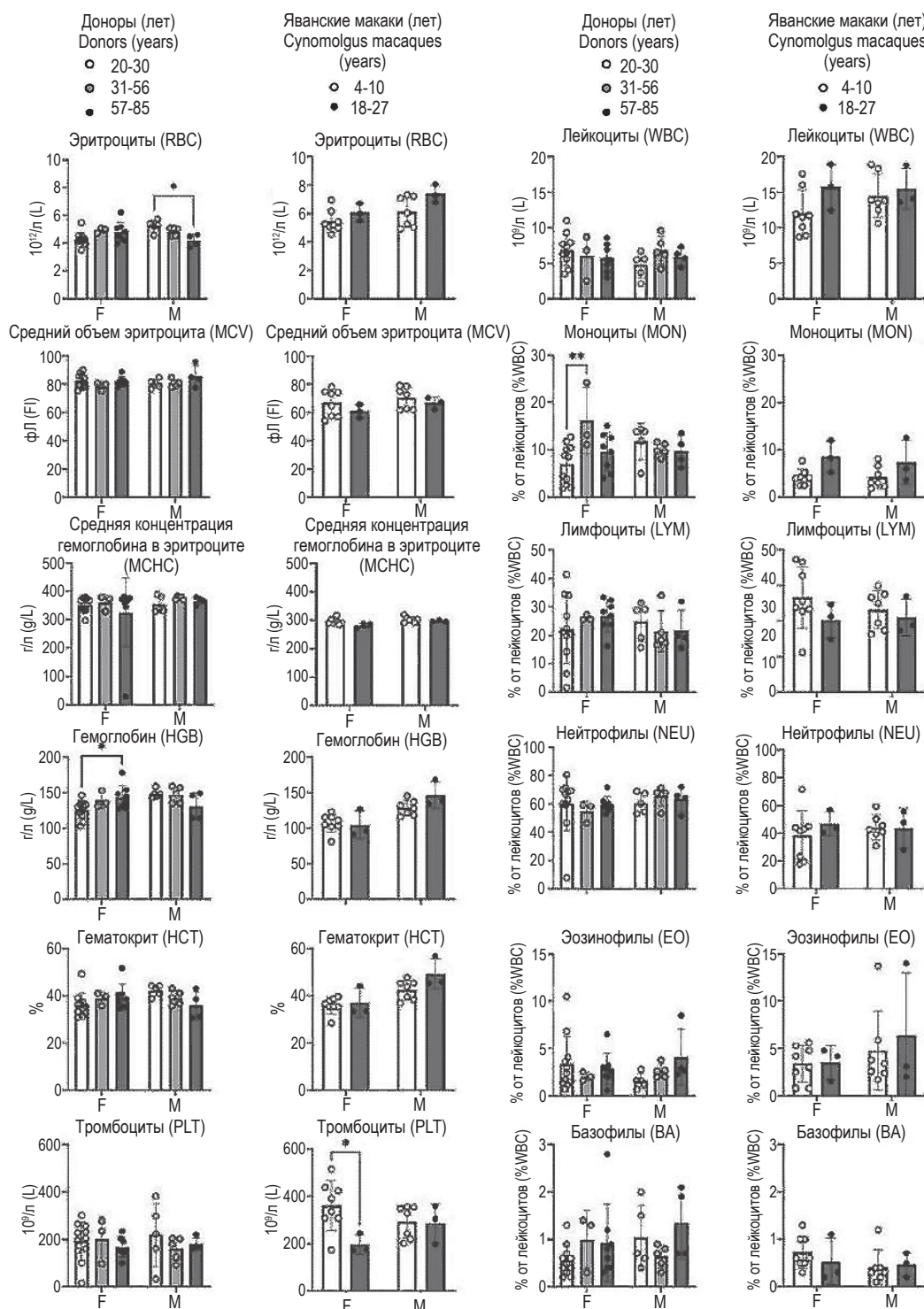


Рисунок 1. Данные общего анализа крови условно здоровых доноров и яванских макак

Примечание. F – женщины и самки макак соответственно, M – мужчины и самцы макак. Условно здоровые доноры: 20-30 лет (медиана – 23 года, 11 женщин, 5 мужчин), 31-56 лет (медиана – 41 год, 3 женщины, 5 мужчин), 57-85 лет (медиана – 61 год, 8 женщин, 4 мужчин); Яванские макаки: 4-9 лет (соответствует 13,2-33,3 человеческим годам, медиана – 6 лет, 7 самок, 7 самцов), 18-27 лет (соответствует 57-89 человеческим годам, 3 самки, 3 самца). Представлены средние и стандартные отклонения. * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$, двухфакторный дисперсионный анализ с множественными сравнениями Сидака.

Figure 1. Complete blood count data from healthy donors and *Cynomolgus* macaques

Note. F, female and female macaques, respectively; M, male and male macaques. Healthy donors: 20-30 years (median 23 years, 11 women, 5 men), 31-56 years (median 41 years, 3 women, 5 men), 57-85 years (median 61 years, 8 women, 4 men); *Cynomolgus* macaques: 4-9 years (corresponds to 13.2-33.3 human years, median 6 years, 7 females, 7 males), 18-27 years (corresponds to 57-89 human years, 3 females, 3 males). Means and standard deviations are shown. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$, two-way ANOVA with Sidak's multiple comparisons.

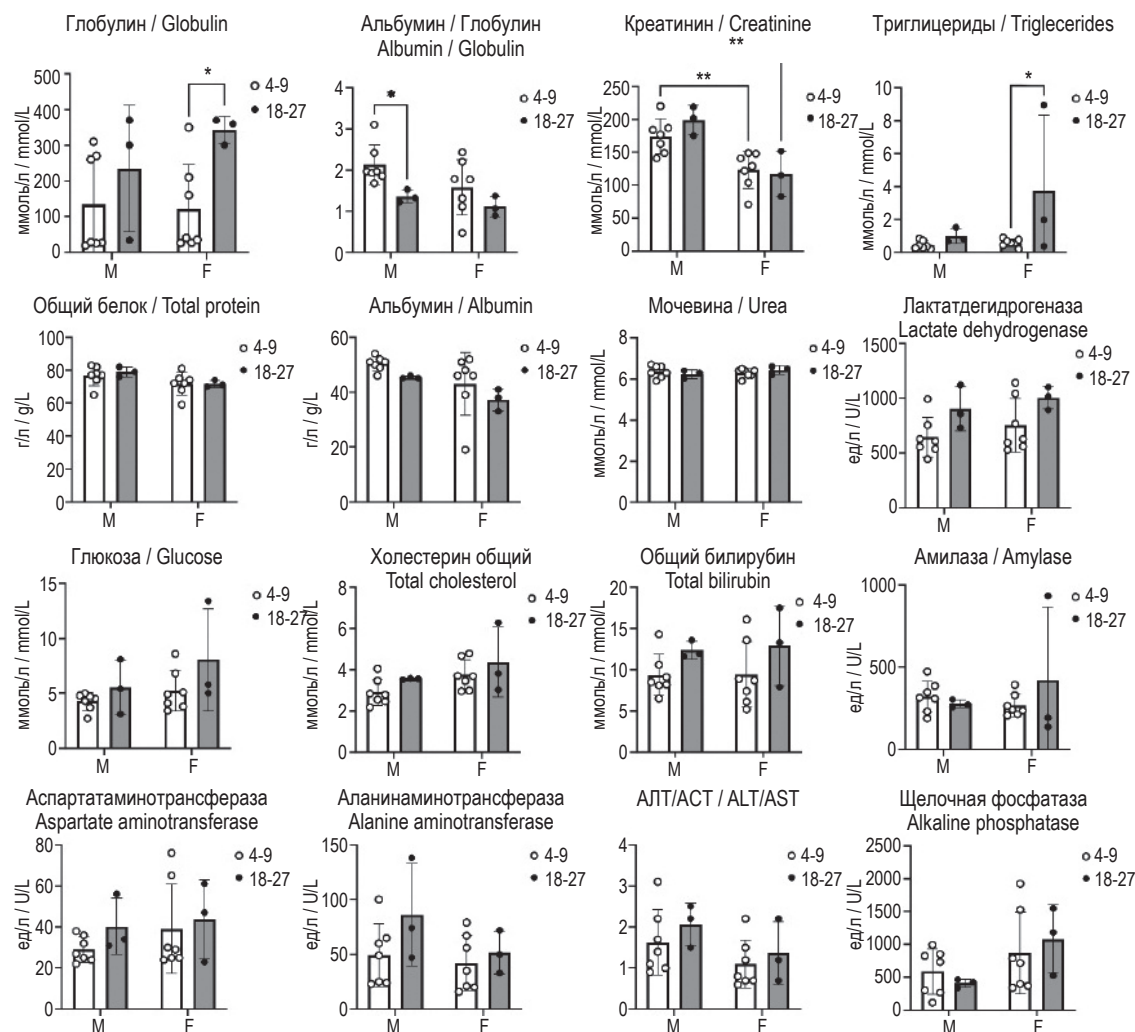


Рисунок 2. Данные биохимического анализа крови яванских макак

Примечание. F – самки макак, M – самцы макак. Яванские макаки: 4-9 лет (соответствует 13,2-33,3 человеческим годам; 7 самок, 7 самцов), 18-27 лет (соответствует 57-89 человеческим годам; 3 самки, 3 самца). Представлены средние и стандартные отклонения. * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$, двухфакторный дисперсионный анализ с множественными сравнениями Сидака.

Figure 2. Blood biochemistry data for *Cynomolgus* macaques

Note. F, female macaques; M, male macaques. *Cynomolgus* macaques: 4-9 years (equivalent to 13.2-33.3 human years; 7 females, 7 males), 18-27 years (equivalent to 57-89 human years; 3 females, 3 males). Means and standard deviations are shown. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$, two-way ANOVA with Sidak's multiple comparisons.

В ходе дальнейшей работы были исследованы биохимические показатели крови, сопровождающие старение яванских макак (рис. 2). Так, обнаружено достоверное повышение уровней триглицеридов и глобулина у самок макак в возрасте 18-27 лет по сравнению с группой самок 4-9 лет, такая же тенденция наблюдается у самцов. У самцов в возрасте 18-27 лет соотношение общего альбумина/глобулина значительно ниже чем у самцов 4-9 лет, снижение этого показателя у самок наблюдали на уровне тенденции (рис. 2). Сравнение биохимических показателей выявило достоверные половые отличия в уровнях креатинина у самцов и самок разных возрастных групп.

Так, уровень креатинина у самцов яванских макак во всех возрастных группах было достоверно выше, чем у самок в тех же возрастных группах. Других достоверных различий в биохимических показателях крови не выявлено. В то же время у самцов и самок прослеживается тенденция к повышению глюкозы, билирубина, холестерина и воспалительных ферментов с возрастом.

Выводы

В результате проведенного исследования были выявлены достоверные вариации в уровнях ряда

показателей общего и биохимического анализов крови.

Наблюдалось снижение количества эритроцитов у мужчин возрастной группы 57-85 лет по сравнению с группой 20-30 лет, увеличение моноцитов у женщин возрастной группы 31-57 лет по сравнению с группой 20-30 лет, увеличение гемоглобина у женщин возрастной группы 57-85 лет по сравнению с группой 20-30 лет.

У яванских макак наблюдалось снижение тромбоцитов у самок возрастной группы 18-27 лет.

Уровни триглицеридов и глобулина у самок макак разных возрастных групп повышаются с возрастом. У самцов макак с возрастом снижается соотношение общего альбумина и глобулина. У самцов макак возрастных групп 4-9 лет и 18-27 лет уровень креатинина выше чем у самок макак этих возрастных групп.

Список литературы / References

1. Chen Y., Ono F., Yoshida T., Yoshikawa Y. Relation between body weight and hematological and serum biochemical parameters in female Cynomolgus Monkey (*Macaca Fascicularis*). *Exp. Anim.*, 2002, Vol. 51, no. 2, pp. 125-131.
2. Choi K., Chang J., Lee M.-J., Wang S., In K., Galano-Tan W.C., Jun S., Cho K., Hwang Y.-H., Kim S.-J., Park W. Reference values of hematology, biochemistry, and blood type in cynomolgus monkeys from cambodia origin. *Lab. Anim. Res.*, 2016, Vol. 32, no. 1, pp. 46-55.
3. Li X., Li D., Biddle K.E., Portugal S.S., Li M.R., Santos R., Burkhardt J.E., Khan N.K. Age- and sex-related changes in body weights and clinical pathology analytes in cynomolgus monkeys (*Macaca Fascicularis*) of Mauritius origin. *Vet. Clin. Pathol.*, 2022, Vol. 51, no. 3, pp. 356-375.
4. Xie L., Xu F., Liu S., Ji Y., Zhou Q., Wu Q., Gong W., Cheng K., Li J., Li L., Fang L., Zhou L., Xie P. Age- and sex-based hematological and biochemical parameters for *Macaca fascicularis*. *PLoS One*, 2013, Vol. 8, no. 6, e64892. doi: 10.1371/journal.pone.0064892.

Авторы:

Сухих А.А. — специалист-исследователь АНОО ВО «Научно-технологический университет «Сириус»», пгт Сириус, Краснодарский край, Россия
Жукова Д.С. — заведующая клинико-ветеринарным отделением НИЦ «Курчатовский институт», Курчатовский комплекс медицинской приматологии, с. Веселое, Краснодарский край, Россия
Карал-оглы Д.Д. — к.б.н., ведущий научный сотрудник, НИЦ «Курчатовский институт», Курчатовский комплекс медицинской приматологии, с. Веселое, Краснодарский край, Россия
Клоц И.Н. — к.б.н., ведущий научный сотрудник, НИЦ «Курчатовский институт», Курчатовский комплекс медицинской приматологии, с. Веселое, Краснодарский край, Россия
Злобина А.П. — лаборант, НИЦ «Курчатовский институт», Курчатовский комплекс медицинской приматологии, с. Веселое, Краснодарский край, Россия
Акулов А.П. — старший лаборант АНОО ВО «Научно-технологический университет «Сириус»», пгт Сириус, Краснодарский край, Россия
Терещенко В.П. — к.м.н., старший научный сотрудник АНОО ВО «Научно-технологический университет «Сириус»», пгт Сириус, Краснодарский край, Россия
Рыбцов С.А. — к.б.н., руководитель ресурсного центра клеточных технологий и иммунологии АНОО ВО «Научно-технологический университет «Сириус»», пгт Сириус, Краснодарский край, Россия

Authors:

Sukhikh A.A., Researcher, Sirius University of Science and Technologies, Sirius settlement, Krasnodar Region, Russian Federation
Zhukova D.S., Head, Veterinary Department, National Research Centre "Kurchatov Institute", Kurchatov Complex of Medical Primatology, Vesyoloye village, Krasnodar Region, Russian Federation
Karal-ogly D.D., PhD (Biology), Leading Researcher, Research Centre "Kurchatov Institute", Kurchatov Complex of Medical Primatology, Vesyoloye village, Krasnodar Region, Russian Federation
Klots I.N., PhD (Biology), Senior Researcher, National Research Centre "Kurchatov Institute", Kurchatov Complex of Medical Primatology, Vesyoloye village, Krasnodar Region, Russian Federation
Zlobina A.P., Technician, National Research Centre "Kurchatov Institute", Kurchatov Complex of Medical Primatology, Vesyoloye village, Krasnodar Region, Russian Federation
Akulov A.P., Senior Technician, Sirius University of Science and Technologies, Sirius settlement, Krasnodar Region, Russian Federation
Tereshchenko V.P., PhD (Medicine), Senior Researcher, Sirius University of Science and Technologies, Sirius settlement, Krasnodar Region, Russian Federation
Rybtsov S.A., PhD (Biology), Head, Resource Center for Cell Technologies and Immunology, Sirius University of Science and Technologies, Sirius settlement, Krasnodar Region, Russian Federation

Поступила 30.03.2025
Отправлена на доработку 11.05.2025
Принята к печати 31.05.2025

Received 30.03.2025
Revision received 11.05.2025
Accepted 31.05.2025

ВЛИЯНИЕ БАКТЕРИОЦИНОВ НА ФУНКЦИИ КЛЕТОК ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА *IN VIVO* И *IN VITRO*

Гейн С.В.^{1,2}, Полюдова Т.В.¹, Ибатуллин М.В.^{1,2}

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

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

Резюме. Цель исследования — изучить влияние варнерина и хоминина — лантибиотиков, выделенных из сред роста *Staphylococcus warneri* и *Staphylococcus hominis* соответственно, а также низина и синтетической полиаминокислоты поли-L-аргинина на функциональную активность клеток врожденного иммунитета *in vivo* и *in vitro*. В работе исследованы лантибиотики варнерин (APD ID: AP02801), полученный из среды роста бактерий *Staphylococcus warneri* DSM 16081, хоминин, выделенный из сред роста *Staphylococcus hominis* ГИСК-284 и низин из *Lactococcus lactis* (Sigma, США), а также поликатионный синтетический пептид с антибактериальными свойствами — поли-L-аргинин гирдохлорид с мол. массой 5000-15000 Да (Sigma, США). В исследованиях *in vivo* объектом служили клетки перитонеальной полости белых лабораторных мышей породы Swiss, массой 20-22 г. Исследуемые пептиды вводили мышам внутрибрюшинно, через 1 ч мышей выводили из эксперимента методом декапитации под эфирным наркозом. В качестве объекта исследований *in vitro* использовались лейкоциты периферической крови здоровых доноров-добровольцев. Поглотительную активность клеток перитонеальной полости оценивали методом проточной цитометрии, продукцию активных форм кислорода (АФК) оценивали с помощью реакции люминолзависимой хемилюминесценции. Установлено, что варнерин и хоминин достоверно модулировали продукцию АФК *in vivo*. Оба пептида усиливали генерацию АФК перитонеальными макрофагами во всем диапазоне исследуемых доз, низин демонстрировал более слабое стимулирующее действие, увеличивая продукцию АФК только в дозе 0,1 мг/кг. Варнерин *in vivo* оказывал статистически значимый угнетающий эффект на поглотительную активность перитонеальных клеток, в то время как хоминин и низин во всем диапазоне исследуемых доз на процент фагоцитоза не влияли. *In vitro* варнерин как в спонтанных, так и в стимулированных пробах в высоких концентрациях угнетал, а в низких — стимулировал образование АФК. Хоминин, напротив, усиливал микробицидный потенциал в нестимулированных культурах, но снижал зиозаниндуцированную продукцию АФК, оба пептида *in vitro* снижали поглотительную активность моноцитов и

Адрес для переписки:

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

Address for correspondence:

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

Образец цитирования:

С.В. Гейн, Т.В. Полюдова, М.В. Ибатуллин «Влияние бактериоцинов на функции клеток врожденного иммунитета *in vivo* и *in vitro*» // Российский иммунологический журнал, 2025. Т. 28, № 3. С. 409-414. doi: 10.46235/1028-7221-17145-IVA

© Гейн С.В. и соавт., 2025
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

S.V. Gein, T.V. Polyudova, M.V. Ibatullin "In vivo and in vitro influence of bacteriocins on the functions of innate immune cells", Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2025, Vol. 28, no. 3, pp. 409-414. doi: 10.46235/1028-7221-17145-IVA

© Gein S.V. et al., 2025
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.46235/1028-7221-17145-IVA

нейтрофилов. Низин и поли-L-аргинин на фагоцитарную активность и микробицидный потенциал влияния не оказывали. Полученные данные подтверждают гипотезу о том, что антимикробные пептиды сдерживают рост конкурентной микрофлоры и оказывают модулирующее действие на врожденный иммунитет.

Ключевые слова: антимикробные пептиды, лантибиотики, макрофаги, нейтрофилы, фагоцитоз, низин, поли-L-аргинин

IN VIVO AND IN VITRO INFLUENCE OF BACTERIOCINS ON THE FUNCTIONS OF INNATE IMMUNE CELLS

Gein S.V.^{a, b}, Polyudova T.V.^{a, b}, Ibatullin M.V.^{a, b}

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

^b Perm State University, Perm, Russian Federation

Abstract. The aim of this study was to investigate the effect of warnerin and hominin, the lantibiotics isolated from the growth media of *Staphylococcus warneri* and *Staphylococcus hominis*, respectively as well as action of nisin and the synthetic polyamino acid poly-L-arginine on the functional activity of innate immune cells *in vivo* and *in vitro*. The study concerned the following lantibiotics: warnerin (APD ID: AP02801), obtained from the growth medium of *Staphylococcus warneri* DSM 16081 bacteria, and hominin, isolated from the growth media of *Staphylococcus hominis* GISK-284 as well as nisin from *Lactococcus lactis* (Sigma, USA), along with poly-L-arginine hydrochloride, a polycationic synthetic peptide with known antibacterial properties (molecular weight, 5000–15000 Da, Sigma, USA). The *In vivo* studies were performed using peritoneal cells of white laboratory Swiss mice weighing 20–22 g. Peripheral blood leukocytes from healthy volunteer donors were used as an object of *in vitro* studies. The absorption activity of peritoneal cavity cells was assessed by flow cytometry, and the production of reactive oxygen species was measured using luminol-dependent chemiluminescence. It was found that both warnerin and hominin did significantly modulate ROS production *in vivo*. Both peptides enhanced ROS generation by peritoneal macrophages at the entire dose scale, whereas nisin showed a weaker stimulatory effect, increasing ROS production only at a dose of 0.1 mg/kg. Warnerin *in vivo* had a statistically significant inhibitory effect on the absorptive activity of peritoneal cells, while hominin and nisin did not affect the percentage of phagocytosis at the entire dose range. *In vitro*, the production of active oxygen forms was inhibited by warnerin in both spontaneous and stimulated tests at high concentrations, and its stimulatory effect was seen at low concentrations. On the contrary, hominin enhanced the microbicidal potential in unstimulated cultures, but decreased zymosan-induced ROS production; both peptides decreased the scavenging activity of monocytes and neutrophils *in vitro*. Nisin and poly-L-arginine had no effect on phagocytic activity and microbicidal potential. The obtained data are in line with a hypothesis that antimicrobial peptides inhibit the growth of competitive microflora and exert a modulatory effect on the cell of innate immunity.

Keywords: antimicrobial peptides, lantibiotics, macrophages, neutrophils, phagocytosis, nisin, poly-L-arginine

Исследования проведены в рамках государственного задания «ИЭГМ УрО РАН», номер государственной регистрации темы № 124020500027-7.

Введение

Кожа человека — это орган, являющийся не только физическим барьером, защищающим от

агрессивных факторов внешней среды, но и уникальной экологической нишей для разнообразных микроорганизмов. Комменсальные бактерии, обитающие на поверхности кожи, играют важную роль в поддержании барьерной функции и иммунного гомеостаза. Основу кожного микробиома составляют преимущественно грамположительные бактерии, включая пред-

ставителей родов *Staphylococcus*, *Corynebacterium* и *Cutibacterium*. Их взаимоотношения между собой и с организмом хозяина связаны с выработкой низкомолекулярных антимикробных соединений, среди которых ключевую роль играют бактериоцины [10]. Особое внимание в последние годы уделяется лантибиотикам — полициклическим пептидным бактериоцинам, содержащим уникальные аминокислотные остатки, такие как лантионин и β -метиллантионин. Именно эти пептиды наиболее часто синтезируются коагулазонегативными стафилококками [4, 6]. Антибактериальная активность лантибиотиков-стафилококцинов распространяется на различных представителей патогенных бактерий, включая *Staphylococcus aureus* и *Streptococcus pyogenes* [12]. Благодаря антибактериальному действию, бактериоцины вовлекаются в формирование микробного баланса кожи, предотвращая гиперколонизацию патогенными штаммами и способствуя доминированию комменсальных видов [11]. Бактерии, продуцирующие лантибиотики и другие антимикробные пептиды, обладают не только конкурентными преимуществами в микробиоте кожи, но и способны модулировать врожденный иммунитет хозяина. Установлено, что бактериоцины стафилококков могут влиять на активацию ряда клеточных популяций, регулируя продукцию провоспалительных цитокинов и антимикробных белков [5, 14]. В то же время характер взаимодействия лантибиотиков с клетками иммунной системы находится в самом начале исследований. Изучение механизмов взаимодействия бактериоцинов с клетками врожденного иммунитета и их способности модулировать функциональную активность макрофагов и гранулоцитов, открывает новые возможности для создания иммуномодулирующих и противомикробных средств, которые могут использоваться в терапии инфекционных и воспалительных заболеваний.

Цель работы — исследование влияния стафилококковых бактериоцинов класса лантибиотиков на функциональную активность клеток врожденного иммунитета *in vivo* и *in vitro*.

Материалы и методы

В работе исследованы лантибиотики варнерин (APD ID:AP02801), полученный из среды роста бактерий *Staphylococcus warneri* DSM 16081 [2], хоминан, выделенный из сред роста *Staphylococcus*

hominis ГИСК-284 [1], и низин из *Lactococcus lactis* (Sigma, США), а также поликатионный синтетический пептид с антибактериальными свойствами — поли-L-агринин гирдохлорид с мол. массой 5000-15000 Да (Sigma, США).

В исследованиях *in vivo* объектом служили перитонеальные макрофаги белых лабораторных мышей породы Swiss, массой 20-22 г. Эксперименты проведены в соответствии с этическими нормами и рекомендациями по гуманизации работы с лабораторными животными, отраженными в Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (Страсбург, 1986). Мышам внутрибрюшинно вводили исследуемые пептиды в дозах 10, 1, и 0,1 мг/кг (контрольной группе вводили 0,9%-ный раствор NaCl), через 1 ч мышей выводили из эксперимента методом декапитации под эфирным наркозом и выделяли лейкоциты перитонеальной полости путем промывания брюшной полости раствором Хенкса с 20 ЕД/мл гепарина. После выделения полученную суспензию центрифугировали при 400 g в течение 10 мин. Для оценки поглотительной активности концентрацию клеток доводили до 2×10^6 , затем 100 мкл FITC-меченных бактерий *Staphylococcus cohnii* (10^9 кл/мл) смешивали со 100 мкл клеток перитонеального смыва (1×10^6), инкубировали в течение 30 мин при 37 °C и промывали 2 раза центрифугированием в буфере DPBS/ЭДТА 0,02% при 4 °C. Регистрацию производили на проточном цитофлуориметре Sino Cyte Flow Cytometer (Китай).

Оценку продукции активных форм кислорода (АФК) производили методом люминолзависимой хемилюминесценции (ЛЗХЛ), в лунки 96-луночного планшета вносили 10^5 клеток в 100 мкл раствора Хенкса. Индуктором и маркером реакции служили опсонизированный зимозан (150 мкг/мл) и люминол (10^{-5} М) соответственно. Результат регистрировался на многофункциональном спектрофотометре TECAN (Австрия) в течение часа с интервалом в 5 мин.

В качестве объекта исследований *in vitro* использовали лейкоциты периферической крови здоровых доноров-добровольцев, которые получали из плазмы путем отстаивания гепаринизированной крови в термостате в течение 2 часов при 37 °C. После чего плазму снимали, центрифугировали при 400 g в течение 20 мин и суспендировали в полной питательной среде (ППС), которую готовили на основе среды 199 с добавле-

нием 10 mM HEPES (Sigma), 2 mM L-глутамин (Sigma), 100 мкг/мл гентамицина и 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС). Варнерин, хоминин, низин и поли-L-аргинин использовали в концентрациях 3 мкг/мл, 0,3 мкг/мл, 0,03 мкг/мл. Поглотительную активность клеток и детекцию выработки АФК производили методами, описанными выше для *in vivo*. Популяции моноцитов и гранулоцитов определяли путем оценки фронтального и бокового светорассеивания, в каждом гейте оценивали 50 000 клеток.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием однофакторного дисперсионного анализа для парных данных и LSD-критерия для межгруппового сравнения для *in vitro* и однофакторного дисперсионного анализа для непарных данных и LSD-критерия для межгруппового сравнения для *in vivo*.

Результаты и обсуждение

Установлено, что *in vivo* лантибиотики варнерин и хоминин усиливали выработку кислородных радикалов клетками перитонеальной полости в спонтанных и стимулированных пробах во всем исследуемом диапазоне концентраций. В сравнении с ними низин проявил значительно меньшую активность — не влиял на спонтанную и усиливал стимулированную ЛЗХЛ только в одной дозе — 0,1 мг/кг. При исследовании влияния пептидов на фагоцитарную активность *in vivo* было установлено, что хоминин и низин во всем диапазоне исследуемых доз на процент фагоцитоза не влияли, в то время как варнерин оказывал статистически значимый угнетающий эффект в дозах 1 и 0,1 мг/кг.

В экспериментах *in vitro* нами было обнаружено, что варнерин и хоминин обладали выраженным модулирующим эффектом по отношению к продукции АФК. Варнерин в высокой концентрации угнетал спонтанную и стимулированную продукцию АФК, а в более низких, напротив, стимулировал. Хоминин спонтанную продукцию АФК во всем диапазоне исследуемых концентраций усиливал, а стимулированную, напротив, угнетал в концентрации 3 мкг/мл. В отличие от варнерина и хоминина, два других бактерицидных пептида — низин и поли-L-аргинин на продукцию АФК лейкоцитами периферической крови влияния не оказывали. Поглотительную способность как моноцитов, так и нейтрофилов *in vitro* варнерин и хоминин ингибировали, в то время как низин и поли-L-аргинин на фагоци-

тарную активность выше указанных клеточных популяций не влияли.

Таким образом, бактериальные пептиды, выделенные из сред роста стафилококков, обладают выраженным иммуномодулирующим действием как *in vitro*, так и *in vivo*. Показано, что катионные антимикробные пептиды могут активировать клетки врожденного иммунитета благодаря взаимодействию с мембранными рецепторами и влиянию на клеточный метаболизм [9]. В системе *in vivo* все исследуемые нами пептиды стимулировали продукцию АФК, особенно выражено данный эффект проявлялся у пептидов, выделенных из сред культивирования коагулазонегативных стафилококков — варнерина и хоминина. Лантибиотик низин, получаемый из сред роста молочнокислых бактерий *L. lactis* обладал менее выраженным эффектом на микробицидный потенциал. На поглотительную активность клеток перитонеального смыва *in vivo* значимое действие оказывал только варнерин, которое выражалось в снижении фагоцитарной активности.

В системе *in vitro* выраженное угнетающее действие на поглотительную активность макрофагов и гранулоцитов было зарегистрировано как у варнерина, так и у хоминина, в то же время направленность действия этих пептидов на микробицидный потенциал зависела от концентрации пептида и присутствия активирующего сигнала. Такая полифункциональность является одной из особенностей пептидов данной группы. Так, например, продуцируемый бактериями *Streptococcus salivarius* лантибиотик сальвариоцин разнонаправлено регулирует фагоцитоз, продукцию кислородных радикалов и провоспалительных цитокинов [3, 8]. Известно также о продукции бактериями *Staphylococcus epidermidis* фенолорастворимых модулинов, регулирующих функции иммунных клеток кожи [5, 13]. Угнетение фагоцитоза является свидетельством особой функции антимикробных пептидов, защищающей стафилококков-продуцентов от клеток врожденного иммунитета и способствующей повышению выживаемости микробных популяций в организме хозяина.

В то же время у низина и поли-L-аргинина, которые, обладая выраженной противомикробной активностью модулирующих эффектов в отношении клеток врожденного иммунитета *in vitro*, выявить не удалось. Это может быть связано с тем, что низин — продукт синтеза молочнокис-

лых бактерий, проявляет преимущественно прямую антимикробную активность и модулировать функции клеток иммунной системы может только в определенных условиях [7, 15].

Выводы

1. Антимикробные пептиды способны одновременно подавлять рост конкурентной ми-

крофлоры и модулировать врожденный иммунитет.

2. Обнаруженные различия в действиях отдельных пептидов *in vitro* и *in vivo* позволяют предположить, что иммуномодулирующее действие пептидов может опосредоваться различными молекулярными механизмами и клеточными мишенями.

Список литературы / References

1. Лемкина Л.М., Коробов В.П., Полюдова Т.В. Антибактериальный пептид хоминин klp-1 широкого спектра действия. Патент RU № 2528055 C1, 10.09.2014. [Lemkina L.M., Korobov V.P., Polyudova T.V. Patent RU No. 2528055 C1, 10.09.2014].
2. Полюдова Т.В., Лемкина Л.М., Лихацкая Г.Н., Коробов В.П. Оптимизация условий получения и моделирование 3D-структуры нового антибактериального пептида семейства лантибиотиков // Прикладная биохимия и микробиология, 2017. Т. 53 № 1. С. 47-54. [Polyudova T.V., Lyamkina L.M., Likhatskaya G.N., Korobov V.P. Optimization of the conditions for obtaining and modeling the 3D structure of a new antibacterial peptide of the lantibiotic family. *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya = Applied Biochemistry and Microbiology*, 2017, Vol. 53, no. 1, pp. 47-54. (In Russ.)]
3. Barbour A., Smith L., Oveisi M., Williams M., Huang R.C., Marks C., Fine N., Sun C., Younesi F., Zargaran S., Oruguntty R., Horvath T. D., Haidacher S.J., Haag A.M., Sabharwal A., Hinz B., Glogauer M. Discovery of phosphorylated lantibiotics with proimmune activity that regulate the oral microbiome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2023, Vol. 120, no. 22, e2219392120. doi: 10.1073/pnas.2219392120.
4. Carson D.A., Barkema H.W., Naushad S., De Buck J. Bacteriocins of non-aureus staphylococci isolated from bovine milk. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2017, Vol. 83, no. 17, e01015-17. doi: 10.1128/AEM.01015-17.
5. Cogen A.L., Yamasaki K., Muto J., Sanchez K.M., Crotty Alexander L., Tanios J., Lai Y., Kim J.E., Nizet V., Gallo R.L. Staphylococcus epidermidis antimicrobial delta-toxin (phenol-soluble modulins-gamma) cooperates with host antimicrobial peptides to kill group A Streptococcus. *PloS One*, 2010, Vol. 5, no. 1, e8557. doi: 10.1371/journal.pone.0008557.
6. Fernández-Fernández R., Elsherbini A.M.A., Lozano C., Martínez A., de Toro M., Zarazaga M., Peschel A., Krismer B., Torres C. Genomic analysis of bacteriocin-producing staphylococci: high prevalence of lanthipeptides and the micrococцин P1 biosynthetic gene clusters. *Probiotics Antimicrob. Proteins*, 2025, Vol. 17, no. 1, pp. 159-174.
7. Field D., Fernandez de Ullivarri M., Ross R.P., Hill C. After a century of nisin research – where are we now? *FEMS Microbiol. Rev.*, 2023, Vol. 47, no. 3, fuad023. doi: 10.1093/femsre/fuad023.
8. Li J., Jin J., Li S., Zhong Y., Jin Y., Zhang X., Xia B., Zhu Y., Guo R., Sun X., Guo J., Hu F., Xiao W., Huang F., Ye H., Li R., Zhou Y., Xiang X., Yao H., Yan Q., Su L., Wu L., Luo T., Liu Y., Guo X., Qin J., Qi H., He J., Wang J., Li Z. Tonsillar microbiome-derived lantibiotics induce structural changes of IL-6 and IL-21 receptors and modulate host immunity. *Adv. Sci. (Weinh.)*, 2022, Vol. 9, no. 30, e2202706. doi: 10.1002/advs.202202706.
9. Mookherjee N., Anderson M.A., Haagsman H.P., Davidson D.J. Antimicrobial host defence peptides: functions and clinical potential. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2020, Vol. 19, no. 5, pp. 311-332.
10. Nakatsuji T., Chen T.H., Narala S., Chun K.A., Two A.M., Yun T., Shafiq F., Kotol P.F., Bouslimani A., Melnik A.V., Latif H., Kim J.N., Lockhart A., Artis K., David G., Taylor P., Streib J., Dorrestein P.C., Grier A., Gill S.R., Zengler K., Hata T.R., Leung D.Y.M., Gallo R.L. Antimicrobials from human skin commensal bacteria protect against *Staphylococcus aureus* and are deficient in atopic dermatitis. *Sci. Transl. Med.*, 2017, Vol. 9, no. 378, eaah4680. doi: 10.1126/scitranslmed.aah4680.
11. Nakatsuji T., Gallo R.L. Antimicrobial peptides: old molecules with new ideas. *J. Invest. Dermatol.*, 2012, Vol. 132, no. 3, Pt 2, pp. 887-895.
12. O'Sullivan J.N., Rea M.C., O'Connor P.M., Hill C., Ross R.P. Human skin microbiota is a rich source of bacteriocin-producing staphylococci that kill human pathogens. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 2019, Vol. 95, no. 2, fyy241. doi: 10.1093/femsec/fyy241.
13. Sanford J.A., Gallo R.L. Functions of the skin microbiota in health and disease. *Semin. Immunol.*, 2013, Vol. 25, no. 5, pp. 370-377.

14. Tomic-Canic M., Burgess J.L., O'Neill K.E., Strbo N., Pastar I. Skin microbiota and its interplay with wound healing. *Am. J. Clin. Dermatol.*, 2020, Vol. 21, Suppl. 1, pp. 36-43.
15. Zhang Z.J., Cole C., Lin H., Wu C., Haro F., McSpadden E., van der Donk W.A., Pamer E.G. Exposure and resistance to lantibiotics impact microbiota composition and function. *bioRxiv*, 2023.12.30.573728. doi: 10.1101/2023.12.30.573728.

Авторы:

Гейн С.В. — д.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории биохимии развития микроорганизмов 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

Полудова Т.В. — к.б.н., заведующая лабораторией биохимии развития микроорганизмов Института экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук — филиала ФГБУН «Пермский федеральный исследовательский центр» Уральского отделения Российской академии наук, г. Пермь, Россия

Ибатуллин М.В. — магистрант кафедры микробиологии и иммунологии ФГАОУ ВО «Пермский государственный национальный исследовательский университет»; инженер лаборатории биохимии развития микроорганизмов Института экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук — филиала ФГБУН «Пермский федеральный исследовательский центр» Уральского отделения Российской академии наук, г. Пермь, Россия

Authors:

Gein S.V., PhD, MD (Medicine), Senior Researcher, Laboratory of Biochemistry of Microbial Development, 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 University, Perm, Russian Federation

Polyudova T.V., PhD (Biology), Head, Laboratory of Biochemistry of Microbial Development, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Perm Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation

Ibatullin M.V., Master's Student, Department of Microbiology and Immunology, Perm State University; Engineer, Laboratory of Biochemistry of Microbial Development, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Perm Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation

Поступила 31.03.2025
Отправлена на доработку 01.04.2025
Принята к печати 25.05.2025

Received 31.03.2025
Revision received 01.04.2025
Accepted 25.05.2025

ВЛИЯНИЕ БАКТЕРИЙ БИОПЛЕНОК UPEC И ИХ СУПЕРНАТАНТОВ НА СЕКРЕЦИЮ МИЕЛОПЕРОКСИДАЗЫ И КАТЕПСИНА G НЕЙТРОФИЛАМИ И МОНОНУКЛЕАРАМИ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

Масленникова И.Л.

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. Способность уропатогенных *Escherichia coli* (UPEC) образовывать биопленки является одним из факторов, обуславливающих рецидивы при инфекциях мочевыводящих путей. Миелопероксидаза (МПО) и катепсин G фагоцитов образуют противомикробную защиту при воспалении. Не исключено существование перекрестных взаимодействий между бактериями UPEC, внеклеточным матриксом биопленок и эффекторными клетками иммунной системы. Цель исследования — оценить секрецию МПО и катепсина G нейтрофилами и мононуклеарами периферической крови человека при взаимодействии с клетками биопленок и их супернатантами референтного и клинического UPEC. В работе использовали нейтрофилы и мононуклеарные клетки периферической крови здоровых мужчин ($n = 6$), выделенных на двойном градиенте фиколл-урографина (1,077 г/мл и 1,112 г/мл). Референтный штамм *E. coli* DL82 (*fimH*, *papC*, *papGII*, *sfa*, *hlyA*, *usp*, *fyuA*, *iucD*, *iroCD*, *iroN*) и клинический изолят *E. coli* R44 (*fimH*) (10^6 кл/мл) выращивали в 96-луночных полистироловых планшетах на среде LB в течение 24 ч. Супернатант биопленок стерилизовали фильтрацией (0,22 мкм). Клетки бактерий освобождали из биопленок ультразвуком. Нейтрофилы культивировали с бактериями биопленок или их супернатантами в течение 1 ч, затем открывали при 400 g, супернатант отбирали и замораживали при -20°C . Активность МПО и катепсина G оценивали с использованием О-фенилендиамина дигидрохлорида и N-бензоил-L-тирозин этилового эфира, соответственно, по оптической плотности в супернатантах нейтрофилов и мононуклеарных клеток. Статистическая обработка проведена с использованием программы Excel. Показано, что секреция МПО нейтрофилами увеличивалась при взаимодействии с супернатантами биопленок *E. coli* DL82 в отличие от супернатантов *E. coli* R44. Клетки биопленок *E. coli* DL82 и *E. coli* R44 не влияли на секрецию МПО. Секреция МПО мононуклеарными клетками периферической крови человека оставалась на уровне контроля при действии клеток и супернатантов UPEC. Контакт нейтрофилов с бактериями и супернатантами штамма *E. coli*

Адрес для переписки:

Масленникова Ирина Леонидовна
Институт экологии и генетики микроорганизмов
Уральского отделения Российской академии наук
614081, Россия, г. Пермь, ул. Голева, 13.
Тел.: 8 (342) 280-84-31.
E-mail: I.Maslennikova1974@gmail.com

Address for correspondence:

Irina L. Maslennikova
Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms
13 Golev St
Perm
614081 Russian Federation
Phone: +7 (342) 280-84-31.
E-mail: I.Maslennikova1974@gmail.com

Образец цитирования:

И.Л. Масленникова «Влияние бактерий биопленок UPEC и их супернатантов на секрецию миелопероксидазы и катепсина G нейтрофилами и мононуклеарами периферической крови человека» // Российский иммунологический журнал, 2025. Т. 28, № 3. С. 415-420.
doi: 10.46235/1028-7221-17128-EOU

© Масленникова И.Л., 2025
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

I.L. Maslennikova "Effects of uropathogenic *E. coli* biofilms and their supernates on myeloperoxidase and cathepsin G secretion by human neutrophils and blood mononuclears", Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2025, Vol. 28, no. 3, pp. 415-420.
doi: 10.46235/1028-7221-17128-EOU

© Maslennikova I.L., 2025
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.46235/1028-7221-17128-EOU

R44 приводил к уменьшению концентрации катепсина G в среде по сравнению с контролем. Экзометаболиты бактериальных биопленок UPEC, по-видимому, оказывают более значительное влияние на секреторную активность нейтрофилов, чем сами бактерии.

Ключевые слова: биопленки, *E.coli*, UPEC, МПО, катепсин G, нейтрофилы, мононуклеары

EFFECTS OF UROPATHOGENIC *E. COLI* BIOFILMS AND THEIR SUPERNATANTS ON MYELOPEROXYDASE AND CATHEPSIN G SECRETION BY HUMAN NEUTROPHILS AND BLOOD MONONUCLEARS

Maslennikova I.L.

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

Abstract. The ability of uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) to form biofilms is one of the factors causing recurrent urinary tract infections. Myeloperoxidase and cathepsin G of phagocytic cells contribute to antimicrobial protection during inflammation. The existence of cross-reactions between UPEC bacteria, extracellular matrix of biofilms and effector immune cells also cannot be excluded. The aim of our study was to evaluate the secretion of myeloperoxidase and cathepsin G by neutrophils and mononuclear cells of human peripheral blood upon their interaction with bacteria from biofilms, and supernatants of reference cultures and clinical UPEC isolates. Neutrophils and mononuclear cells of peripheral blood of healthy men (n = 6) were isolated in a double Ficoll-Urografin gradient (1.077 g/mL and 1.112 g/mL). The reference DL82 strain of *E. coli* (*fimH*, *papC*, *papGII*, *sfa*, *hlyA*, *usp*, *fyuA*, *iucD*, *iroCD*, *iroN*), and the *E. coli* R44 clinical isolate (*fimH*) (10^6 cell/mL) were grown in 96-well polystyrene plates on LB medium for 24 h. The biofilm supernatants were sterilized by filtration (0.22 μ M). Bacterial cells were released from the biofilm by sonication. Neutrophils were cultured with biofilm bacteria or their supernatants for 1 h, then centrifuged at 400 g, the supernatant was collected and frozen at -20 °C. MPO and cathepsin G activity was assessed using O-phenylenediamine dihydrochloride and N-benzoyl-L-tyrosine ethyl ester, respectively, by optical density measured in supernatants of neutrophil and mononuclear cell cultures. Statistical processing was performed using Excel software. It was shown that MPO secretion by neutrophils increased upon interaction with *E. coli* DL82 biofilm supernatants, in contrast to *E. coli* R44 supernatants. *E. coli* DL82 and *E. coli* R44 cells of biofilm did not affect MPO secretion. MPO secretion by human peripheral blood mononuclear cells remained at the control level when exposed to UPEC cells and supernatants. Contact of neutrophils with bacteria and supernatants of the *E. coli* R44 strain led to a decrease in the concentration of cathepsin G in the medium compared to the control. Exometabolites of UPEC bacterial biofilms seem to provide a more significant impact on neutrophil secretory activity than the bacteria *per se*.

Keywords: biofilms, *E.coli*, uropathogenic, myeloperoxidase, Cathepsin G, granulocytes, blood mononuclears

Работа выполнена в соответствии с государственным заданием 124020500027-7.

Введение

Уропатогенные штаммы *Escherichia coli* (UPEC) являются основным этиопатогеном при инфекциях мочевыводящих путей (ИМП). Важным фактором, обуславливающим рецидивы

ИМП, является способность UPEC образовывать биопленку с высокоупорядоченным и сложным внеклеточным матриксом [9], который защищает бактерий от антибиотиков и иммунной системы хозяина.

Миелопероксидаза (МПО) — это фермент азурофильных гранул, который вместе с H_2O_2 образует мощную антимикробную систему, предназначенную для уничтожения бактерий. Растворимая

МПО напрямую участвует в модуляции клеточных реакций и гомеостаза тканей. В основном этот фермент содержится в нейтрофилах (до 5% сухого веса клетки), а также в моноцитах и некоторых типах тканевых макрофагов и их предшественниках [5]. Катепсин G принадлежит к семейству сериновых протеаз, известных своей функцией уничтожения патогенов. Катепсин G присутствует в азурофильных гранулах нейтрофилов [7], а также в моноцитах периферической крови человека в пероксидаза-положительных цитоплазматических гранулах [1, 10].

Привлечение нейтрофилов к местам поражения при ИМП является частью воспалительного ответа организма [4]. Способность нейтрофилов проникать в биопленки во многом зависит от активности секретируемого катепсина G [11]. Инфильтрация мононуклеарных фагоцитов в пораженные ткани дополнительно способствует активации нейтрофилов, что в совокупности усиливает фагоцитарные и цитокин-секретирующие функции этих клеток в условиях ИМП [6]. Не исключено существование перекрестных взаимодействий между бактериями UPEC, их внеклеточным матриксом и эффекторными клетками иммунной системы, что влияет на их секреторную активность. В связи с этим целью работы явилось оценить секрецию МПО и катепсина G нейтрофилами и мононуклеарами периферической крови человека при взаимодействии с клетками биопленок и их супернатантами референтного и клинического уропатогенных штаммов *E. coli*.

Материалы и методы

Нейтрофилы и мононуклеары периферической крови здоровых мужчин ($n = 6$) выделяли на двойном градиенте фиколл-урографина (1,077 г/мл и 1,112 г/мл). Жизнеспособность клеток оценивали в тесте с трипановым синим (97%).

Референтный штамм *Escherichia coli* DL82 (*fimH*, *papC*, *papGII*, *sfa*, *hlyA*, *usp*, *fyuA*, *iucD*, *iroCD*, *iroN*) [13] и клинический изолят *E. coli* R44 (*fimH*), выделенный от пациентов с ИМП [12] (10^6 кл/мл) выращивали в 96-луночных полистироловых планшетах на среде LB (Sigma-Aldrich, США) в течение 24 ч. Биопленочный супернатант стерилизовали фильтрацией (0,22 мкм). Клетки бактерий освобождали из биопленок ультразвуком (Elma Ultrasonic 30S; 5 раз по 1 мин).

Нейтрофилы и мононуклеары периферической крови (250 мкл в RPMI; 10^6 кл/мл) культивировали с бактериями биопленок (100 мкл суспензии) в течение 1 ч, затем откручивали при 400 g, супернатант отбирали и замораживали при -20°C . Нейтрофилы (250 мкл в RPMI; 10^6 кл/мл) культивировали с биопленочными супернатанта-

ми UPEC (250 мкл) в течение 1 ч, пробы откручивали при 400 g, супернатант отбирали и замораживали при -20°C .

Активность МПО и катепсина G оценивали с использованием О-фенилендиамин дигидрохлорида (Sigma, США) и N-бензоил-L-тирозин этилового эфира (Sigma, США), соответственно, по оптической плотности в супернатантах нейтрофилов и мононуклеарных клеток, согласно И.Л. Масленниковой и соавт. [2]. Статистическая обработка проведена с использованием программы Excel.

Результаты и обсуждение

Как показано на рисунке 1А, секреция МПО нейтрофилами увеличивалась при взаимодействии с супернатантами биопленок *E. coli* DL82, в отличие от супернатантов *E. coli* R44, где изменений по сравнению с контролем не наблюдалось. Взаимодействие с клетками указанных штаммов также не оказывало влияния на секрецию МПО.

Секреция МПО мононуклеарными клетками периферической крови человека оставалась на уровне контроля после взаимодействия с клетками биопленок и их супернатантами штаммов *E. coli* DL82 и *E. coli* R44 (рис. 1Б).

Секреция сериновой протеазы катепсина G нейтрофилами не изменялась при взаимодействии с клетками биопленок и их супернатантами штамма *E. coli* DL82, в то время как контакт нейтрофилов со штаммом *E. coli* R44 (клетки бактерий и их супернатанты) приводил к уменьшению концентрации катепсина G в среде по сравнению с контролем (рис. 1В).

Секреторная активность мононуклеарных клеток в отношении катепсина G при контакте с штаммами *E. coli* DL82 и *E. coli* R44 под воздействием клеток биопленок и их супернатантов оставалась на уровне контрольных значений (рис. 1Г).

В патогенезе ИМП участвуют различные факторы вирулентности штаммов UPEC. В рамках данного исследования биопленочные штаммы различны по своим факторам вирулентности: штамм *E. coli* DL82 обладает набором генов, кодирующих адгезины (*fimH*, *sfaDE*, *papC*, *papGII*, *Afa*, *afa/draBC*), инвазины (*ibeA*), системы захвата железа (*iroN*, *fyuA*, *iucD*, *iroCD*), а также токсины, такие как цитотоксический некротизирующий фактор-1 (*cnf1*) и гемолизин α (*hlyA*), в отличие от невирулентного штамма *E. coli* R44.

Активация внешней секреции нейтрофилов может происходить под воздействием внешних факторов, таких как липополисахарид (LPS) [14]. Это может объяснить повышение уровня МПО в среде после воздействия супернатантов штамма

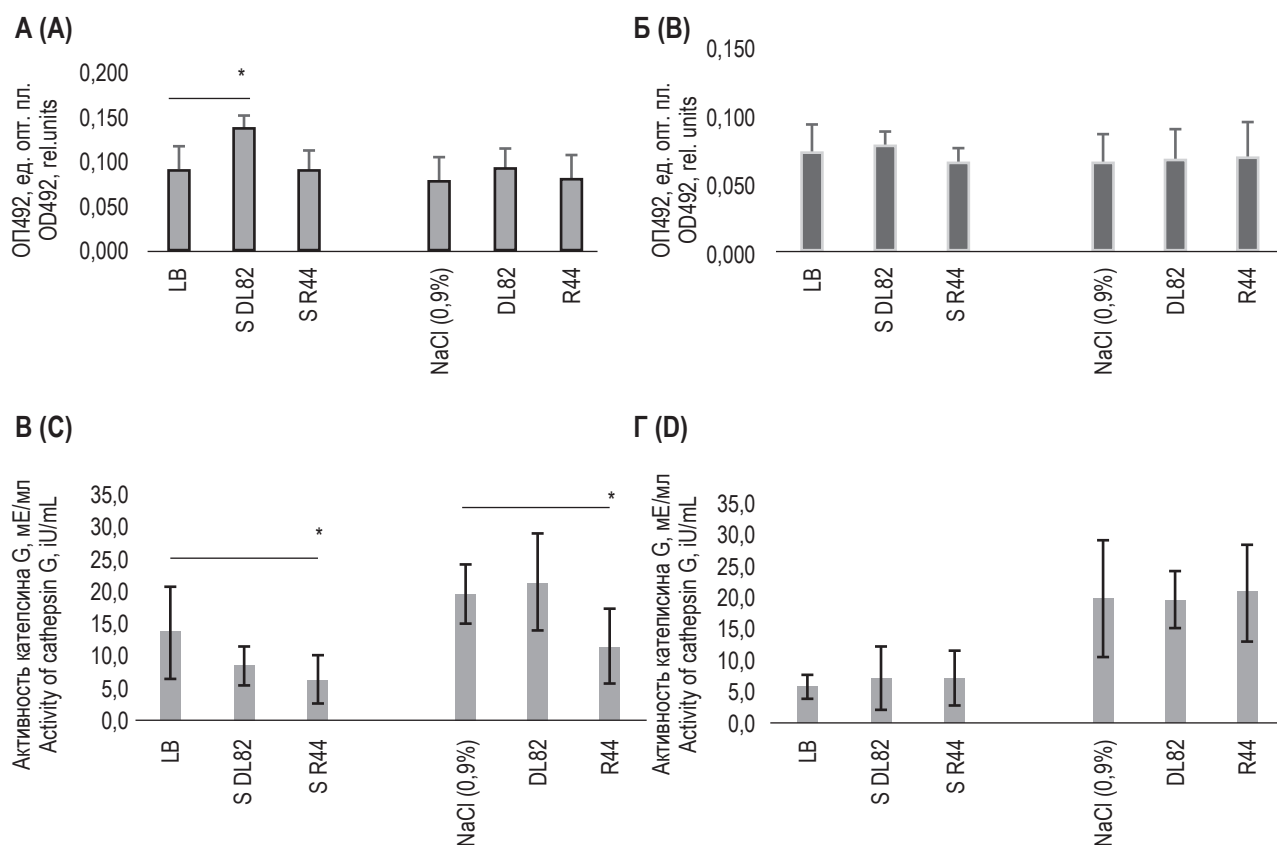


Рисунок 1. Секретция МПО (А, В) и катепсина G (Б, Г) нейтрофилами (А, В) и мононуклеарными клетками (Б, Г) при взаимодействии с клетками и супернатантами (S) UPEC штаммов DL82 и R44

Figure 1. Secretion of MPO (A, B) and cathepsin G (C, D) by neutrophils (A, C) and mononuclear cells (B, D) upon interaction with cells and supernatants (S) of UPEC DL82 and R44

DL82, так как присутствие вирулентных факторов может активировать нейтрофилы и иммунный ответ.

Цитотоксический некротизирующий фактор, секретируемый бактериями UPEC, может приводить к изменению проницаемости клеточной мембраны нейтрофилов, что рассматривается как механизм, препятствующий элиминации патогена. Гемолизин α имеет цитолитическое действие по отношению к нейтрофилам и мононуклеарам, при сублитических концентрациях проявляет иммуномодулирующие эффекты [15]. Повышение внешней секреции МПО нейтрофилами при взаимодействии с супернатантами штамма *E. coli* DL82, вероятно, связано с лизисом нейтрофилов, поскольку при контакте с супернатантами *E. coli* R44, геном которого не характеризуется наличием факторов патогенности, внешняя секреция нейтрофилов оставалась неизменной. Эти механизмы играют ключевую роль в процессе элиминации UPEC при ИМП.

Секреторная МПО активность нейтрофилов не изменялась при взаимодействии с бактериями биопленок обоих штаммов *E. coli* DL82 и R44, вероятно, вследствие их фагоцитоза.

Нейтрофильные сериновые протеазы человека, к которым относится катепсин G, активируются на поверхности нейтрофилов. Они в основном остаются связанными с плазматической мембраной во время экзоцитоза гранул, позволяя нейтрофилам модулировать свой воспалительный ответ посредством сохранения своей каталитической активности [8]. С этим может быть связано снижение активности катепсина G при действии бактерий биопленок и их супернатантов штамма *E. coli* R44 (рис. 1B).

Штаммы с низким вирулентным потенциалом часто являются причиной хронической инфекции, т. к. быстро запускают апоптотические механизмы нейтрофилов [2]. Вероятно, уход в апоптоз нейтрофилов при контакте с бактериями

E. coli R44 также является причиной снижения внешней секреции катепсина G.

Неклассические функции нейтрофилов, включая их взаимодействие с различными типами иммунных клеток, такими как макрофаги и моноциты, играют важную роль в связывании врожденного и адаптивного иммунитета [14]. Вне зависимости от уровня вирулентности штаммов UPEC, в рамках нашего исследования мононуклеары периферической крови не продемонстрировали изменений в секреции МПО и катепсина G в ответ на воздействие биопленочных бактерий и их супернатантов. Это может свидетельствовать о том, что при инфекциях мочевыводящих путей

(ИМП) данный тип иммунных клеток не демонстрирует секреторных эффектов при контакте с биопленками UPEC.

Заключение

Таким образом, показано, что экзометаболиты бактерий и, вероятно, компоненты межклеточного матрикса бактериальных биопленок UPEC, включая экзополисахариды, белки, липиды, тейхоевые кислоты и внеклеточную ДНК, а также вирулентные факторы, оказывают более значительное влияние на фагоциты, чем сами бактерии.

Список литературы / References

1. Замолодчикова Т.С., Толпыго С.М., Шойбонов Б.Б., Котов А.В. Катепсин G человека – многофункциональная протеаза иммунитета // Иммунология, 2018. Т. 39, № 2-3. С. 151-157. [Zamolodchikova T.S., Tolpygo S.M., Shoibonov B.B., Kotov A.V. Human cathepsin G – multifunctional immunity protease. *Immunologiya = Immunologiya*, 2018, Vol. 39, no. 2-3, pp. 151-157. (In Russ.)]
2. Масленникова И.Л., Некрасова И.В., Орлова Е.Г., Горбунова О.Л., Ширшев С.В. Взаимодействие нейтрофилов, предобработанных гормонами, с биопленками комменсального и уропатогенного штаммов *Escherichia coli* in vitro // Инфекция и иммунитет, 2020. Т. 10, № 1. С. 64-72. [Maslennikova I.L., Nekrasova I.V., Orlova E.G., Gorbunova O.L., Shirshov S.V. In vitro interaction of hormone-conditioned neutrophils with commensal and uropathogenic *Escherichia coli* biofilms. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2020, Vol. 10, no. 1, pp. 64-72. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-IVI-1146.
3. Кузнецова М.В., Масленникова И.Л., Некрасова И.В., Ширшев С.В. Влияние супернатантов смешанной культуры *Pseudomonas aeruginosa* и *Escherichia coli* на апоптоз, некроз и окислительную активность нейтрофилов // Доклады Академии наук, 2015. Т. 461, № 1. С. 110-113. [Kuznetsova M.V., Maslennikova I.L., Nekrasova I.V., Shirshov S.V. Effect of mixed culture supernatants of *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* on apoptosis, necrosis, and oxidative activity of neutrophils. *Doklady Akademii nauk = Reports of the Academy of Sciences*, 2015, Vol. 461, no. 1, pp. 112-115. (In Russ.)]
4. Abraham S.N., Miao Y. The nature of immune responses to urinary tract infections. *Nat. Rev. Immunol.*, 2015, Vol. 15, no. 10, pp. 655-663.
5. Atwal M., Lishman E.L., Austin C.A., Cowell I.G. Myeloperoxidase enhances etoposide and mitoxantrone-mediated DNA damage: a target for myeloprotection in cancer chemotherapy. *Mol. Pharmacol.*, 2017, Vol. 91, no. 1, pp. 49-57.
6. Berry M.R., Mathews R.J., Ferdinand J.R., Jing C., Loudon K.W., Wlodek E., Dennison T.W., Kuper C., Neuhofer W., Clatworthy M.R. Renal sodium gradient orchestrates a dynamic antibacterial defense zone. *Cell*, 2017, Vol. 170, no. 5, pp. 860-874.e19.
7. Gao S., Zhu H., Zuo X., Luo H. Cathepsin G and its role in inflammation and autoimmune diseases. *Arch. Rheumatol.*, 2018, Vol. 33, no. 4, pp. 498-504.
8. Gigon L., Yousefi S., Karaulov A., Simon H.U. Mechanisms of toxicity mediated by neutrophil and eosinophil granule proteins. *Allergol. Int.*, 2021, Vol. 70, no. 1, pp. 30-38.
9. Hung C., Zhou Y., Pinkner J.S., Dodson K.W., Crowley J.R., Heuser J., Chapman M.R., Hadjifrangiskou M., Henderson J.P., Hultgren S.J. *Escherichia coli* biofilms have an organized and complex extracellular matrix structure. *mBio*, 2013, Vol. 4, no. 5, e00645-13. doi: 10.1128/mBio.00645-13.
10. Kargi H.A., Campbell E.J., Kuhn C. 3rd. Elastase and cathepsin G of human monocytes: heterogeneity and subcellular localization to peroxidase-positive granules. *J. Histochem. Cytochem.*, 1990, Vol. 38, no. 8, pp. 1179-1186.
11. Kavanaugh J.S., Leidal K.G., Nauseef W.M., Horswill A.R. Cathepsin G degrades *Staphylococcus aureus* biofilms. *J. Infect. Dis.*, 2021, Vol. 223, no. 11, pp. 1865-1869.
12. Kuznetsova M.V., Maslennikova I.L., Pospelova J.S., Žgur Bertok D., Starčić Erjavec M. Differences in recipient ability of uropathogenic *Escherichia coli* strains in relation with their pathogenic potential. *Infect. Genet. Evol.*, 2022, Vol. 97, 105160. doi: 10.1016/j.meegid.2021.105160.
13. Kuznetsova M.V., Pospelova J.S., Maslennikova I.L., Starčić Erjavec M. Dual-species biofilms: biomass, viable cell ratio/cross-species interactions, conjugative transfer. *Int. J. Mol. Sci.*, 2023, Vol. 24, no. 19, pp. 76-82.

14. Melbouci D., Haidar Ahmad A., Decker P. Neutrophil extracellular traps (NET): not only antimicrobial but also modulators of innate and adaptive immunities in inflammatory autoimmune diseases. *RMD Open*, 2023, Vol. 9, no. 3, e003104. doi: 10.1136/rmdopen-2023-003104.
15. Olson P.D., Hunstad D.A. Subversion of host innate immunity by uropathogenic *Escherichia coli*. *Pathogens*, 2016, Vol. 5, no. 1, 2. doi: 10.3390/pathogens5010002.

Автор:

Масленникова И.Л. — к.б.н., старший 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:

Maslennikova I.L., PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratory of Immunoregulation, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Perm Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation

Поступила 19.03.2025

Отправлена на доработку 20.03.2025

Принята к печати 25.05.2025

Received 19.03.2025

Revision received 20.03.2025

Accepted 25.05.2025

АНТИЦИТОКИНОВАЯ АКТИВНОСТЬ МИКРООРГАНИЗМОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ БАКТЕРИАЛЬНОМ ПРОСТАТИТЕ

Попова Л.П., Кузьмин М.Д., Карташова О.Л.

Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза Уральского отделения Российской академии наук — обособленное структурное подразделение ФГБУН «Оренбургский федеральный исследовательский центр» Уральского отделения Российской академии наук, г. Оренбург, Россия

Резюме. Целью настоящего исследования является оценка антицитокиновой активности условно-патогенных микроорганизмов, выделенных из секрета предстательной железы у пациентов с хроническим бактериальным простатитом (ХБП). Опыты *in vitro* были проведены на 50 штаммах условно-патогенных микроорганизмов разных видов, выделенных из секрета предстательной железы у мужчин, обратившихся с жалобами на ХБП и подтвержденным диагнозом. Выделенные микроорганизмы включали различные виды стафилококков (*Staphylococcus aureus*, *S. haemolyticus*, *S. epidermidis*), *Enterococcus faecalis* и *Escherichia coli*. Для оценки антицитокиновой активности (АЦА) бактерий в отношении цитокинов IL-4, IL-6, IL-8, IL-17A и фактора некроза опухоли альфа (TNF α) был использован иммуноферментный метод с использованием наборов ООО «Цитокин» (Санкт-Петербург). Полученные данные продемонстрировали, что антицитокиновый признак широко распространен среди разных видов условно-патогенных микроорганизмов, выделенных из секрета предстательной железы у больных ХБП. В частности, было установлено, что изоляты *S. aureus* проявляют статистически значимые отличия уровня АЦА в отношении IL-6 и IL-17A, а культуры *S. haemolyticus* — в отношении IL-4 по сравнению с другими изученными микроорганизмами. При этом выраженность АЦА в отношении IL-8 и TNF α у бактерий разных видов достоверно не различалась. АЦА можно рассматривать как важный маркер выживания бактерий в условиях длительного взаимодействия с факторами местного иммунитета хозяина при ХБП. Дальнейшие исследования в этом направлении могут дать новые практически полезные сведения, в том числе касающиеся разработки новых подходов к диагностике хронического бактериального простатита.

Ключевые слова: антицитокиновая активность, хронический бактериальный простатит, секрет простаты, стафилококки, энтерококки, кишечные палочки

ANTICYTOKINE ACTIVITY OF MICROORGANISMS ISOLATED IN CHRONIC BACTERIAL PROSTATITIS

Popova L.P., Kuzmin M.D., Kartashova O.L.

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

Abstract. The purpose of the present study was to evaluate the anticytokine activity of opportunistic microorganisms isolated from the prostate gland secretions in patients with chronic bacterial prostatitis (CBP). *In*

Адрес для переписки:

Попова Лидия Петровна
Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза
Уральского отделения Российской академии наук
460000, Россия, г. Оренбург, ул. Пионерская, 11.
Тел.: 8 (932) 543-33-96.
E-mail: ploomy@list.ru

Address for correspondence:

Lidia P. Popova
Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis
11 Pionerskaya St
Orenburg
460000 Russian Federation
Phone: +7 (932) 543-33-96.
E-mail: ploomy@list.ru

Образец цитирования:

Л.П. Попова, М.Д. Кузьмин, О.Л. Карташова
«Антицитокиновая активность микроорганизмов,
выделенных при хроническом бактериальном
простатите» // Российский иммунологический
журнал, 2025. Т. 28, № 3. С. 421–424.
doi: 10.46235/1028-7221-17150-AAO

© Попова Л.П. и соавт., 2025
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

L.P. Popova, M.D. Kuzmin, O.L. Kartashova "Anticytokine
activity of microorganisms isolated in chronic bacterial
prostatitis", Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy
Immunologicheskii Zhurnal, 2025, Vol. 28, no. 3, pp. 421–424.
doi: 10.46235/1028-7221-17150-AAO

© Popova L.P. et al., 2025
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.46235/1028-7221-17150-AAO

vitro testing was performed with 50 strains of pathogenic bacterial species isolated from the prostate secretions of males who had complaints and confirmed diagnosis of CBP. Isolated bacteria included different *Staphylococcus* species (*Staphylococcus aureus*, *S. haemolyticus*, *S. epidermidis*), *Enterococcus faecalis* и *Escherichia coli*. To assess the anti-cytokine activity (ACA) of bacteria in relation to cytokines of IL-4, IL-6, IL-8, IL-17A and tumor necrosis factor alpha (TNF α), ELISA technique was used using the Cytokine SLR kits (St. Petersburg). The obtained data demonstrated that the anticytokine activity is widespread among various types of conditionally pathogenic bacteria isolated from the prostate gland secretions in patients with CBP. In particular, we have found that the isolates of *S. aureus* show statistically significant differences in the ACA level towards IL-6 and IL-17A. The cultures of *S. haemolyticus* were active in relation to IL-4 compared to other studied microorganisms. Meanwhile, the expression of ACA against IL-8 and TNF α did not differ for different bacterial species. Anticytokine activity may be considered an important marker of bacterial survival under conditions of prolonged interaction with factors of local host immunity in CBP. Further studies in this direction can give new practically useful insights, including those relating to the development of new approaches to the diagnosis of chronic bacterial prostatitis.

Keywords: anticytokine activity, chronic bacterial prostatitis, prostate secret, staphylococcus, enterococcus, intestinal bacilli

Введение

В настоящее время простатит рассматривается как заболевание предстательной железы, обусловленное множеством факторов, возбудителей и ассоциированное тремя основными показателями: болевой синдром в области гениталий, премежностное, нарушенное мочеиспускание и качество жизни больных [1].

Бухарин О.В. с соавторами (2020) предположили, что выявленные ими изменения антипептидной активности микробиоты в отношении ряда цитокинов, также могут вносить свой вклад в нарушение иммунного гомеостаза биотопа, приводя к формированию очага хронической инфекции [2].

Известно, что при простатите отмечаются нарушения в гуморальном и местном звеньях иммунитета. Установлено, что у пациентов с хроническим бактериальным простатитом (ХБП) наблюдаются патологические изменения иммунологических показателей, свидетельствующие о депрессии иммунной системы (снижение уровней IFN α и IFN γ , sIgA, функциональной активности нейтрофилов, повышение концентраций IgG, IgM) [3].

Другие авторы отмечают, что цитокины выявляют в повышенных концентрациях даже у относительно здоровых лиц, но их уровень, безусловно, еще больше повышается при наличии в предстательной железе любого очага воспаления [4, 5].

Установлено значение грамположительных микроорганизмов и атипичных бактерий при ХБП [6, 7]. Проведенный данными авторами обзор литературы показал, что наиболее часто при ХБП выделялись *Enterococcus faecalis* (46,9%), *Staphylococcus spp.* (22,3%), *Escherichia coli* (15,1%) и атипичные бактерии (6,0%).

Вместе с тем недостаточно исследовано влияние этих микроорганизмов на локальный цитокиновый профиль хозяина.

Цель исследования — оценить АЦА условно-патогенных микроорганизмов, выделенных из секрета простаты больных ХБП.

Материалы и методы

В работе исследованы клинические штаммы, выделенные из секрета простаты больных ХБП: *Enterococcus faecalis* (n = 10), *Staphylococcus aureus* (n = 10), *S. haemolyticus* (n = 10), *S. epidermidis* (n = 10), *Escherichia coli* (n = 10).

Видовую принадлежность микроорганизмов оценивали с помощью масс-спектрометра MALDI-TOF серии Microflex (Bruker Daltonics, Германия), идентификацию микроорганизмов с расчетом коэффициента достоверности проводили с использованием программного обеспечения Maldi BioTyper 3.0.

АЦА микроорганизмов в отношении IL-4, IL-6, IL-8, TNF α и IL-17A определяли методом иммуноферментного анализа по известной методике [3] с использованием наборов ООО «Цитокин» (Санкт-Петербург). В центрифужные пробирки вносили по 150 мкл взвеси микроорганизмов и растворы соответствующих цитокинов в соотношении 1:1, пробы инкубировали в течение 2 часов при 37 °C. После инкубации реакцию останавливали на холоде, пробы центрифугировали при 3000 об/мин в течение 15 мин (+4 °C) и отбирали супернатанты, результаты учитывали на фотометре StatFax 2100 (США) при длине волны 450 нм.

В качестве контроля использовали растворы цитокинов, внесенные в физиологический раствор. Конечная концентрация цитокинов в контрольных пробах составляла для IL-4 — 30,7 пг/мл, IL-6 — 83,3 пг/мл, IL-8 — 83,3 пг/мл, TNF α — 52,3 пг/мл и IL-17A — 461,5 пг/мл. Для оценки АЦА вычисляли долю инактивации цитокинов в опыте относительно контроля и выражали в пг/мл.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием пакета программ Microsoft Excel 2007 и BIOSTATISTICA. Значимость различий средних величин показателей оценивали с помощью методов вариационной

статистики (t-критерий Стьюдента). Статистически значимыми отличия считали при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

У изученных микроорганизмов установлена АЦА в отношении IL-4, IL-6, IL-8, TNF α и IL-17A.

Условно-патогенные микроорганизмы разных видов характеризовались самым высоким уровнем выраженности АЦА в отношении IL-17A ($123,9 \pm 9,02$ пг/мл). Экспрессия признака была максимальной у штаммов *S. aureus* ($157 \pm 9,8$ пг/мл) и в 1,4 – 1,7 раза превышала аналогичный показатель у изолятов *S. haemolyticus* ($111,2 \pm 8,5$ пг/мл, $p < 0,01$), *S. epidermidis* ($102,9 \pm 8,9$ пг/мл, $p < 0,001$), *E. coli* ($97,8 \pm 8,9$ пг/мл, $p < 0,001$) и *E. faecalis* ($91,8 \pm 8,1$ пг/мл, $p < 0,001$).

Максимальный уровень АЦА в отношении IL-8 выявлен у штаммов *S. epidermidis* ($40,7 \pm 2,6$ пг/мл) и уменьшался в ряду *E. coli* ($39,6 \pm 2,4$ пг/мл), *E. faecalis* ($38,9 \pm 2,9$ пг/мл), *S. haemolyticus* ($34,3 \pm 1,8$ пг/мл), *S. aureus* ($34,2 \pm 2,6$ пг/мл).

Выраженность АЦА в отношении TNF α у разных видов микроорганизмов отличалась незначительно, составив у *S. epidermidis* $27,4 \pm 1,8$ пг/мл, у *S. haemolyticus* $27,9 \pm 1,7$ пг/мл, у *E. faecalis* $27,6 \pm 2,1$ пг/мл, у *E. coli* $26,7 \pm 2,1$ пг/мл, у *S. aureus* $24,6 \pm 1,8$ пг/мл.

Экспрессия признака в отношении IL-6 была самой высокой у изолятов *S. aureus* ($6,5 \pm 0,7$ пг/мл), а самой низкой у *S. haemolyticus* ($3,3 \pm 0,2$ пг/мл, $p < 0,001$). У других изученных видов микроорганизмов АЦА была достоверно выше, чем у гемолитических стафилококков и составляла в среднем у *S. epidermidis* $5,9 \pm 0,3$ пг/мл, $p < 0,001$, у *E. coli* – $5,1 \pm 0,7$ пг/мл, $p < 0,05$, у *E. faecalis* – $4,6 \pm 0,2$ пг/мл, $p < 0,001$.

Кроме того, выявлены статистически значимые отличия в уровне АЦА в отношении IL-6 у *S. aureus* ($p < 0,01$) и *S. epidermidis* ($p < 0,01$) по сравнению с *E. faecalis*.

Проведенные исследования показали, что АЦА в отношении IL-4 оказалась достоверно более высокой у *S. haemolyticus* ($7,2 \pm 0,51$ пг/мл, $p < 0,01$), *S. epidermidis* ($6,7 \pm 0,6$ пг/мл, $p < 0,05$) и *E. coli* ($6,7 \pm 0,3$ пг/мл, $p < 0,01$) по сравнению с *E. faecalis*

($5,1 \pm 0,5$ пг/мл), средний уровень выраженности признака у *S. aureus* составлял $6,2 \pm 0,6$ пг/мл.

Таким образом, результаты исследования свидетельствуют о широком распространении антицитокинового признака среди разных видов условно-патогенных бактерий, выделенных из секрета простаты у больных ХБП.

В настоящее время широко изучается цитокиновый профиль хозяина при ХБП [8].

Роль дисбаланса цитокинов в патогенезе хронического простатита к настоящему времени убедительно продемонстрирована как в экспериментальных моделях заболевания [9, 10], так и в многочисленных клинических исследованиях [11, 12].

Установлено важное значение оценки цитокинового профиля у больных ХБП для диагностики заболевания [14]. Показана диагностическая значимость IL-4 в развитии мужского бесплодия у больных с хроническим простатитом [15]. Полученные данные представляют интерес в связи с тем, что ранее у стафилококков разных видов, выделенных из секрета предстательной железы у мужчин с симптомами урогенитальной инфекции, установлено наличие АЦА, причем самая высокая выраженность признака отмечена у *Staphylococcus xylosus* в отношении IL-4 [13].

Исследовано влияние микробиоты, выделенной из спермоплазмы, на локальный цитокиновый профиль у мужчин с ХБП и установлено иммуномодулирующее действие симбиотических бактерий, выделенных как от здоровых лиц, так и больных ХБП. Получены достоверные данные о высоком уровне АЦА в отношении TNF α , IFN γ и IL-17 у штаммов коринебактерий, IL-10 у стафилококков, TNF α и IL-10 у вейлонелл, выделенных от больных [2].

Выводы

АЦА можно рассматривать как маркер выживания бактерий в условиях длительного взаимодействия с факторами местного иммунитета хозяина при ХБП.

Дальнейшие исследования в этом направлении могут дать новые практически полезные сведения, в том числе касающиеся диагностики ХБП.

Список литературы / References

1. Бухарин О.В., Кузьмин М.Д., Перунова Н.Б., Никифоров И.А., Чайникова И.Н., Иванова Е.В. Диагностический цитокиновый маркер бесплодия мужчин – интерлейкин 4 // Клиническая лабораторная диагностика, 2022. Т. 67, № 3. С. 151-157. [Bukharin O.V., Kuzmin M.D., Perunova N.B., Nikiforov I.A., Chaynikova I.N., Ivanova E.V. Diagnostic cytokine marker of male infertility – interleukin 4. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika = Russian Clinical Laboratory Diagnostics*, 2022, Vol. 67, no. 3, pp. 151-157. (In Russ.)]
2. Бухарин О.В., Кузьмин М.Д., Перунова Н.Б., Иванова Е.В., Бекбергенова А.В., Бондаренко Т.А. Характеристика микробиоты и цитокинового профиля спермоплазмы у больных хроническим бактериальным простатитом // Урология, 2020. № 5. С. 67-72. [Bukharin O.V., Kuzmin M.D., Perunova N.B., Ivanova E.V., Bekbergenova A.V., Bondarenko T.A. Characterization of the microbiota and cytokine profile of spermoplasm in patients with chronic bacterial prostatitis. *Urologiya*, 2020, no. 5, pp. 67-72. (In Russ.)]
3. Бухарин О.В., Перунова Н.Б., Чайникова И.Н., Иванова Е.В., Смолягин А.И. Антицитокиновая активность микроорганизмов // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии, 2011. № 4. С. 56-61. [Bukharin A.V., Perunova N.B., Chaynikova I.N., Ivanova E.V., Smolyagin A.I. Anti-cytokine activity of microorganisms of languages. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2011, no. 4, pp. 56-61. (In Russ.)]

4. Камалов А.А., Ефремов Е.А., Дорофеев С.Д., Охоботов Д.А., Мельник Я.И., Бедретдинова Д.А. Клинико-иммунопатологические аспекты хронического бактериального простатита на фоне проведения иммуномодулирующей терапии // Урология и нефрология, 2007. № 3. С. 10-12. [Kamalov A.A., Efremov E.A., Dorofeev S.D., Okhobotov D.A., Melnik Ya.I., Bedretdinova D.A. Clinical and immunopathological aspects of chronic bacterial prostatitis against the background of immunomodulating therapy. *Urologiya i nefrologiya = Urology and Nephrology*, 2007, no. 3, pp. 10-12. (In Russ.)]
5. Карташова О.Л., Пашкова Т.М., Пашина О.А., Морозова Н.В. Антицитокиновая активность и способность к продукции цитокиноподобных веществ стафилококков, выделенных из секрета предстательной железы у мужчин с симптомами урогенитальной инфекции // Российский иммунологический журнал, 2021. Т. 24, № 2. С. 257-260. [Kartashova O.L., Pashkova T.M., Pashinina O.A., Morozova N.V. Anti-cytokine activity and ability to produce cytokine-like substances of staphylococci isolated from the secret of the anterior gland in men with symptoms of urogenital infection. *Rossiyskiy immunologicheskii zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2021, Vol. 24, no. 2, pp. 257-260. (In Russ.)] doi: 10.46235/1028-7221-995-aaa.
6. Коган М.И., Набока Ю.Л., Исмаилов Р.С., Белоусов И.И., Гудима И.А. Бактериальный простатит: эпидемиология и этиология // Урология, 2018. № 6. С. 144-148. [Kogan M.I., Naboka Y.L., Ismailov R.S., Belousov I.I., Gudima I.A. Bacterial prostatitis: epidemiology and etiology. *Urologiya = Urology*, 2018, no. 6, pp. 144-148. (In Russ.)]
7. Коган М.И., Набока Р.С., Исмаилов Р.С. Микробиота секрета простаты: сравнительный анализ хронического простатита II и IIIA категории // Урология, 2020. № 2. С. 16-22. [Kogan M.I., Naboka R.S., Ismailov R.S. Microbiota secret of prostate: comparative analysis of chronic prostatitis of categories II and IIIA. *Urologiya = Urology*, 2020, no. 2, pp. 16-22. (In Russ.)]
8. Тюзиков И.А., Греков Е.А., Смирнов А.В. Локальная цитокинотерапия в комплексном лечении хронического простатита // Эффективная фармакотерапия, 2022. Т. 18, № 27. С. 26-38. [Tyuzikov I.A., Grekov E.A., Smirnov A.V. Local cytokinotherapy in the complex treatment of chronic prostatitis. *Effektivnaya farmakoterapiya = Effective Pharmacotherapy*, 2022, Vol. 18, no. 27, pp. 26-38. (In Russ.)]
9. Borisov V.V. Chronic prostatitis. Clinical lecture No. 1: Etiology and pathogenesis. *Therapy*, 2024, no. 2, pp. 110-120.
10. Chen L., Xia W.P., Zhou Z.H. Morphological and proinflammatory expression of the experimental autoimmune prostatitis in the rat model. *Zhonghua Nan Ke Xue*, 2007, Vol. 13, no. 5, pp. 444-448.
11. Füllöp T., Larbi A., Witkowski J.M. Human inflammation. *Gerontology*, 2019, Vol. 65, no. 5, pp. 495-504.
12. He H., Luo H., Xu H., Qian B., Zou X., Zhang G., Zeng F., Zou J. Preclinical models and evaluation criteria of prostatitis. *Front. Immunol.*, 2023, Vol. 14, 1183895. (In Chinese) doi: 10.3389/fimmu.2023.1183895.
13. He Q.X., Li X.D. Chronic prostatitis and cytokines. *Zhonghua Nan Ke Xue*, 2011, Vol. 17, no. 10, pp. 939-942. (In Chinese)
14. Mendoza-Rodríguez R., Hernández-Chico I., Gutiérrez-Soto B., Navarro-Marí J.M., Gutiérrez-Fernández J. Microbial etiology of bacterial chronic prostatitis: systematic review. *Rev. Esp. Quimioter.*, 2023, Vol. 36, no. 2, pp. 144-151. (In Spanish)
15. Yao C., Narumiya S. Prostaglandin-cytokine crosstalk in chronic inflammation. *Br. J. Pharmacol.*, 2019, Vol. 176, no.3, pp. 337-354.

Авторы:

Попова Л.П. — к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории персистенции и симбиоза микроорганизмов Института клеточного и внутриклеточного симбиоза Уральского отделения Российской академии наук — обособленного структурного подразделения ФГБУН «Оренбургский федеральный исследовательский центр» Уральского отделения Российской академии наук, г. Оренбург, Россия

Кузьмин М.Д. — д.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории по изучению механизмов формирования микробных биоценозов человека Института клеточного и внутриклеточного симбиоза Уральского отделения Российской академии наук — обособленного структурного подразделения ФГБУН «Оренбургский федеральный исследовательский центр» Уральского отделения Российской академии наук, г. Оренбург, Россия

Карташова О.Л. — д.б.н., доцент, ведущий научный сотрудник лаборатории персистенции и симбиоза микроорганизмов Института клеточного и внутриклеточного симбиоза Уральского отделения Российской академии наук — обособленного структурного подразделения ФГБУН «Оренбургский федеральный исследовательский центр» Уральского отделения Российской академии наук, г. Оренбург, Россия

Authors:

Popova L.P., PhD (Medicine), Senior Researcher, Laboratory of Microbial Persistence and Symbiosis, Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, Orenburg Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Orenburg, Russian Federation

Kuzmin M.D., PhD, MD (Medicine), Leading Researcher, Laboratory for the Study of the Mechanisms of Formation of Human Microbial Biocenosis, Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, Orenburg Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Orenburg, Russian Federation

Kartashova O.L., PhD, MD (Biology), Associate Professor, Leading Researcher, Laboratory of Microbial Persistence and Symbiosis, Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, Orenburg Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Orenburg, Russian Federation

Поступила 28.03.2025
Отправлена на доработку 03.04.2025
Принята к печати 25.05.2025

Received 28.03.2025
Revision received 03.04.2025
Accepted 25.05.2025

ПРЕКУЛЬТИВИРОВАНИЕ КЛЕТОК, ПОДВЕРГАВШИХСЯ ДЛИТЕЛЬНОЙ КРИОКОНСЕРВАЦИИ, НЕГАТИВНО ВЛИЯЕТ НА ПРОЛИФЕРАТИВНУЮ АКТИВНОСТЬ Т-ЛИМФОЦИТОВ

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. Мононуклеарные клетки периферической крови являются ценным биологическим материалом для большинства иммунологических исследований. Криоконсервация мононуклеарных клеток периферической крови обеспечивает доступ к большим объемам биоматериала в любой момент времени. Исходя из того, что криоконсервация может влиять на различные параметры клеток, рядом авторов было предложено введение этапа прекультивирования размороженных клеток для восстановления их функций. Цель исследования — оценка влияния прекультивирования клеток, подвергавшихся длительной криоконсервации, на пролиферативную активность Т-лимфоцитов. В работе была использована венозная кровь, полученная от 18 относительно здоровых добровольцев, подписавших информированное согласие. Мононуклеарные лейкоциты выделяли путем центрифугирования в градиенте плотности диаколла общепринятым методом. Полученные клетки подвергали контролируемому замораживанию до -80°C в течение суток, затем переносили в жидкий азот. Длительность хранения образцов составила $40 \pm 1,4$ мес. После размораживания клетки делили на две части, одну из которых сразу окрашивали 5(6)-карбоксифлуоресцеин диацетат-N-сукцинимидиловым эфиром (CFSE), стимулировали фитогемагглютином и культивировали в полной питательной среде, содержащей интерлейкин-2, в течение 7 суток. Вторую часть клеток прекультивировали в полной питательной среде (18 часов), затем обрабатывали, как указано выше. Оценку пролиферации Т-лимфоцитов проводили методом проточной цитометрии. Установлено, что этап прекультивирования не влияет на относительное количество пролиферирующих Т-лимфоцитов. Вместе с тем в пробах с прекультивированными клетками было снижено число дочерних генераций, формируемых как CD4^{+} , так и CD8^{+} -лимфоцитами. Кроме того, выявлено значительное увеличение доли умирающих элементов среди вступивших в деление CD4^{+} -клеток. При этом в пуле CD8^{+} -лимфоцитов данного последствия этапа прекультивирования не было отмечено. Таким образом, прекультивирование клеток существенно увеличивает процент Т-лимфоцитов, гибнущих в процессе деления. Данный феномен был

Адрес для переписки:

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

Address for correspondence:

Larisa B. Korolevskaya
Institute of Ecology and Genetics 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 «Прекультивирование клеток, подвергавшихся длительной криоконсервации, негативно влияет на пролиферативную активность Т-лимфоцитов» // Российский иммунологический журнал, 2025. Т. 28, № 3. С. 425-430.
doi: 10.46235/1028-7221-17125-POC

© Королевская Л.Б., Шмагель К.В., 2025
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

L.B. Korolevskaya, K.V. Shmagel "Precultivation of cells subjected to long-term cryopreservation negatively affects proliferative activity of T lymphocytes", Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2025, Vol. 28, no. 3, pp. 425-430.
doi: 10.46235/1028-7221-17125-POC

© Korolevskaya L.B., Shmagel K.V., 2025
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.46235/1028-7221-17125-POC

обнаружен только среди CD4⁺T-клеток, что, по-видимому, отражает их большую чувствительность к гибели *in vitro* по сравнению с CD8⁺T-лимфоцитами.

Ключевые слова: T-лимфоциты, криоконсервация, пролиферация, прекультивирование (отдых), проточная цитометрия

PRECULTIVATION OF CELLS SUBJECTED TO LONG-TERM CRYOPRESERVATION NEGATIVELY AFFECTS PROLIFERATIVE ACTIVITY OF T LYMPHOCYTES

Korolevskaya L.B., Shmagel K.V.

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

Abstract. Peripheral blood mononuclear cells are a valuable biological material for most immunological studies. Cryopreservation of peripheral blood mononuclear cells provides access to large amounts of biomaterial at any time. Since cryopreservation can affect various cell parameters, several authors have proposed introducing a precultivation step for thawed cells to restore their functions. The aim of the study is to evaluate the effect of preculturing long-term cryopreserved cells on T lymphocyte proliferative capacity. Venous blood obtained from 18 relatively healthy volunteers who signed informed consent was used. Mononuclear leukocytes were isolated by centrifugation in a diacoll density gradient using a standard method. The resulting cells were subjected to controlled freezing at -80 °C for 24 hours before being transferred to liquid nitrogen. The duration of sample storage was 40±1.4 months. After thawing, the cells were divided into two parts; one part was immediately stained with 5(6)-carboxyfluorescein diacetate N-succinimidyl ester (CFSE), stimulated with phytohemagglutinin, and cultured in complete culture medium containing interleukin-2 for 7 days. The second part of the cells was precultivated in complete culture medium (18 hours) and then treated as described above. T lymphocyte proliferation was assessed by flow cytometry. It was found that the preculture stage did not affect the relative counts of proliferating T lymphocytes. However, the number of daughter generations formed by both CD4⁺ and CD8⁺T lymphocytes was reduced in samples with precultured cells. Additionally, a significant increase in the proportion of dying elements among dividing CD4⁺T cells was observed. This consequence of the preculture stage was not found in the pool of CD8⁺T lymphocytes. Thus, preculturing significantly increases the percentage of T lymphocytes dying during division. This phenomenon was only detected among CD4⁺T cells, which appears to reflect their greater sensitivity to *in vitro* death compared to CD8⁺T lymphocytes.

Keywords: T lymphocytes, cryopreservation, proliferation, precultivation (rest), 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

Пролиферация T-лимфоцитов необходима для формирования эффективного адаптивного иммунного ответа. Использование проточной цитометрии для оценки пролиферативной активности T-клеток служит рутинным методом в клеточной биологии, иммунологии, клинической медицине. Однако доступность образцов в больших количествах в определенное время и в

определенном месте остается сложной задачей, поэтому сбор и криоконсервация мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК) для последующего анализа являются обычной практикой. Вместе с тем негативными последствиями криоконсервации могут быть, например, снижение экспрессии поверхностных и/или внутриклеточных маркеров, а также изменение функциональной активности клеток [4, 9]. Для сглаживания эффектов криоконсервации рядом авторов был введен этап прекультивирования: отдых приготовленных после разморозки МКПК в культуральной среде в течение 14-18 часов при +37 °C [4, 8]. Считается, что процесс покоя удалит клетки, обреченные на гибель, и позволит

«отдохнувшим» клеткам восстановить функциональные способности [6, 8]. Представленные в доступной литературе данные, как правило, отражают сравнение показателей функциональной активности свежеизолированных и криоконсервированных МКПК либо оценивают последствие сроков криоконсервации (1-12 мес.) на состояние и функции различных клеток [3, 4, 5, 9]. При этом авторы не всегда вносят в протокол исследования этап «отдыха» клеток.

Целью настоящей работы была оценка влияния прекультивирования клеток, подвергавшихся длительной (более трех лет) криоконсервации, на пролиферативную активность Т-лимфоцитов.

Материалы и методы

Объектом исследования служили МКПК 18 относительно здоровых доноров, среди которых преобладали мужчины (61%). Средний возраст обследованных субъектов составил $37,4 \pm 1,2$ года. Исследование было одобрено этическим комитетом «ИЭГМ УрО РАН» (IRB 00010009), каждый участник подписал информированное согласие. Забор крови проводили в вакуумные пробирки, содержащие этилендиаминтетрауксусную кислоту (Weihai Hongyu Medical Devices Co Ltd, Китай). Мононуклеарные клетки выделяли путем центрифугирования двукратно разведенной крови раствором фосфатно-солевого буфера Дульбекко (DPBS, Gibco, США) в градиенте плотности Диаколл (1,077, ООО «Диаэм», Россия). Выделенные клетки после двукратного отмывания в растворе DPBS помещали в термоинактивированную эмбриональную телячью сыворотку (ЭТС, Biowest, Колумбия), содержащую 10% диметилсульфоксида (AppliChem, Германия). Криопробирки с клетками подвергали контролируемому замораживанию в коммерческих штативах CoolCell (Corning, США) в морозильной камере (-80°C) в течение суток, после чего переносили в криохранилище с жидким азотом (-196°C) до последующего использования. Средняя продолжительность хранения образцов составила $40 \pm 1,4$ мес.

Перед проведением исследования криопробирки с МКПК размораживали (водяная баня, $+37^{\circ}\text{C}$). К клеткам, перенесенным в 15-мл пробирки, капельно вносили десятикратный объем полной питательной среды (ППС): RPMI-1640, содержащая 25 мМ Хепеса и 2 мМ L-глутамин (Gibco, США), 10% ЭТС, 100 ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина (Sigma-Aldrich, США). После центрифугирования (400 g, 10 мин) клеточный осадок ресуспендировали в ППС. Подсчет жизнеспособных клеток проводили в камере Горяева с окраской трипановым синим.

Доля жизнеспособных клеток составила не менее 92%.

Полученные клетки делили на две части, одну из которых сразу после разморозки (проба «свеже размороженные») окрашивали 5 мкМ 5(6)-карбоксифлуоресцеина диацетат-N-сукцинимидилового эфира (CFSE, BioLegend, США) и инкубировали при $+37^{\circ}\text{C}$ в течение 8 мин. Затем для прекращения реакции клетки дважды отмывали средой RPMI-1640, содержащей 20% ЭТС. После подсчета в камере Горяева клетки ресуспендировали в концентрации 1×10^6 /мл в ППС, содержащей 100 нг/мл интерлейкина-2 (IL-2, Gibco, США). Пролиферацию клеток индуцировали внесением фитогемагглютинаина-П (ФГА, Serva, Германия) в конечной концентрации 15 мкг/мл. Пробу культивировали в течение 7 суток ($+37^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2). Контролем служили нестимулированные клетки, окрашенные CFSE, и стимулированные пробы без красителя. На 3-4-е сутки культуральную среду в каждой пробе меняли на среду соответствующего состава. Вторую часть размороженных клеток помещали в пробирки с ППС и инкубировали в течение 18 часов ($+37^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2), чтобы дать время на восстановление (проба «прекультивированные»). После этого клетки окрашивали CFSE и культивировали с ФГА или без него, согласно вышеописанному протоколу.

По окончании времени инкубации клетки собирали, окрашивали витальным красителем Zombie UV, моноклональными анти-CD3-BV605, анти-CD4-PE, анти-CD8-BV-510 антителами (BioLegend, США) и анализировали с использованием проточного цитофлуориметра CytoFLEX S (Beckman Coulter, США). Среди стимулированных CD4^+ и CD8^+ Т-лимфоцитов определяли долю пролиферирующих клеток (CFSE^{low}), подсчитывали число дочерних генераций и процент клеток, гибнущих в процессе деления ($\text{ZombieUV}^+\text{CFSE}^{\text{low}}$).

Статистический анализ и визуализацию данных проводили с помощью программного обеспечения GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, США). Количественные данные представлены в виде медиан и интерквартильных размахов ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$). Множественные сравнения между группами проводили с помощью критерия Тьюки. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез приняли равным 0,05.

Результаты и обсуждение

Оценка пролиферативной активности Т-лимфоцитов, размороженных после длительной (более трех лет) криоконсервации и стимулирован-

ных *in vitro* в течение 7 суток, показала следующее. Доля $CD4^+CFSE^{low}$ -клеток в пробах «свежезамороженные» составила $79,5 \pm 2,3\%$, в образцах с прекультивированными клетками — $79,7 \pm 1,6\%$. Аналогичные показатели были установлены при оценке относительного количества поделившихся $CD8^+$ -лимфоцитов. Процент $CD8^+CFSE^{low}$ в пробах «свежезамороженные» и «прекультивированные» составил $78,6 \pm 4,6\%$ и $77,9 \pm 3,6\%$ соответственно. Ранее рядом исследователей при оценке пролиферативной способности клеток, культивированных сразу после разморозки, было установлено, что доля $CD4^+CFSE^{low}$ и $CD8^+CFSE^{low}$ не превышала 30% [9]. Необходимо отметить, что в указанной работе использованная авторами культуральная среда не содержала IL-2. Поскольку IL-2 является важным фактором выживания Т-лимфоцитов [1], возможно, что его отсутствие в культуральной среде могло приводить к снижению митотической активности клеток. Кроме того, на функциональность клеток могут влиять такие факторы, как состав среды для заморозки и длительность криоконсервации, этап прекультивирования клеток, индукторы и продолжительность стимуляции, а также ряд других [2, 5, 8]. Полученные нами в настоящей работе данные свидетельствуют о том, что почти 80% Т-лимфоцитов, размороженных после длительной (более трех лет) криоконсервации, отвечают на стимуляцию митогеном, индуцирующим переход клетки из состояния покоя к делению. При этом внесение в протокол исследования предварительного этапа «отдых» не влияет на относительное число пролиферирующих $CD4^+$ и $CD8^+$ -лимфоцитов.

Вместе с тем проведенная нами оценка количества дочерних генераций, образуемых стимулированными в течение 7 суток Т-лимфоцитами, выявила негативный эффект этапа «отдых» (рис. 1).

Прекультивирование размороженных клеток существенно уменьшало число дочерних генераций, формируемых как $CD4^+$, так и $CD8^+$ -лимфоцитами ($p < 0,001$). Исходя из того, что в пробах «прекультивированные» по сравнению с пробами «свежезамороженные» снижение количества дочерних генераций не сопровождается изменением доли $CFSE^{low}$ клеток, можно предположить следующее. В прошедших этап «отдыха» культурах клеток большее число Т-лимфоцитов вступают в деление, однако они совершают меньше митозов. Это справедливо, как для $CD4^+$, так и $CD8^+$ субпопуляций Т-лимфоцитов.

Известно, что криоконсервация и последующее размораживание запускают в клетках процессы, ведущие к гибели. Причинами этого могут быть физический стресс, вызывающий морфологические изменения, накопление в митохондри-

ях и цитозоле свободных радикалов, активация рецепторов смерти и др. [7, 9]. Проведенная нами оценка жизнеспособности делящихся Т-лимфоцитов, стимулированных в течение 7 суток, показала следующее (рис. 2).

В пробах «свежезамороженные» относительное количество $CD4^+$ и $CD8^+$ -клеток, гибнущих в процессе деления, было сопоставимо. Вместе с тем прекультивирование клеток приводило к значительному увеличению доли умирающих элементов среди вступивших в деление $CD4^+$ -лимфоцитов ($p < 0,001$). При этом в пуле $CD8^+$ -клеток аналогичного последствия этапа «отдых» не было отмечено. Более того, после прекультивирования процент гибнущих элементов среди вступивших в деление $CD8^+$ -лимфоцитов был существенно ниже, чем среди $CD4^+$ -клеток ($p < 0,01$). Ранее рядом авторов было отмечено, что этап прекультивирования снижает процент гибнущих клеток среди лимфоцитов, оказывая положительное влияние на восстановление их функций [8]. Другими исследователями было показано, что дополнительный «отдых» не улучшал способность Т-лимфоцитов к продукции интерферона-гамма в ответ на стимуляцию разными антигенами по сравнению клетками, стимулированными непосредственно после разморозки [5]. В настоящей работе нами установлено, что прекультивирование размороженных после криоконсервации клеток приводит к увеличению доли гибнущих в процессе деления Т-лимфоцитов, стимулированных в течение 7 суток. При данных экспериментальных условиях $CD4^+$ -клетки оказываются наиболее чувствительными к гибели по сравнению с $CD8^+$ -лимфоцитами.

Таким образом, хотя криоконсервация клеток является рутинным методом для последующей оценки их функционального состояния, данные, представленные в доступной литературе, весьма противоречивы. Поскольку после разморозки Т-лимфоциты демонстрируют относительно высокую выживаемость и способность к пролиферации, большинство исследований, как правило, сфокусированы на сравнении и оптимизации различных методологических подходов [4, 5, 8, 9]. Так, группой авторов был отмечен позитивный эффект этапа «отдых» на восстановление ряда функций Т-лимфоцитов [8], тогда как другими исследователями этого не выявлено [5]. В настоящей работе нами проведена оценка влияния этапа «отдых» размороженных после длительной (более трех лет) криоконсервации мононуклеарных клеток периферической крови на пролиферативную активность Т-лимфоцитов, стимулированных в течение 7 суток. Мы показали, что среди прошедших прекультивирование клеток доля пролиферирующих $CD4^+$ и $CD8^+$ -

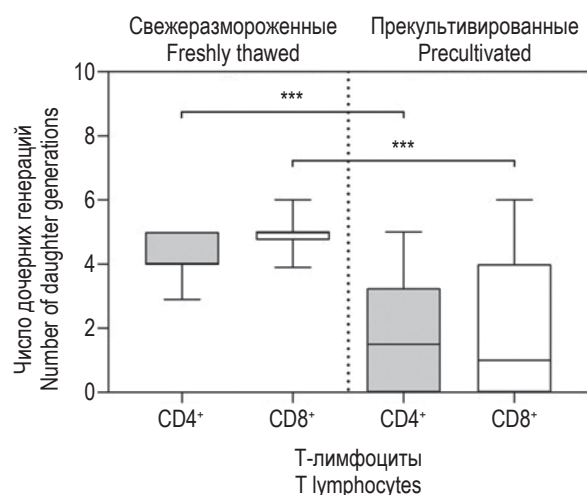


Рисунок 1. Влияние прекультивирования прошедших криоконсервацию клеток на количество дочерних поколений, формируемых стимулированными Т-лимфоцитами

Примечание. Свежезамороженные: приготовленные после разморозки клетки были окрашены CFSE, стимулированы фитогемагглютинином и культивированы в течение 7 суток. Прекультивированные: приготовленные после разморозки клетки были оставлены на 18 часов в полной питательной среде, затем окрашены CFSE, стимулированы фитогемагглютинином и культивированы в течение 7 суток (см. раздел «Материалы и методы»). Представлены медианы (горизонтальные линии), межквартильные размахи (прямоугольники) и 10-90%-ные интервалы (вертикальные отрезки). *** – $p < 0,001$ (однофакторный дисперсионный анализ с последующим сравнением с помощью критерия Тьюки).

Figure 1. Effect of cryopreserved cells precultivation on the number of daughter generations formed by stimulated T lymphocytes

Note. Freshly thawed: cells prepared after thawing were stained with CFSE, stimulated with phytohemagglutinin and cultured for 7 days. Precultivated: Cells prepared after thawing were left in complete culture medium for 18 hours, then stained with CFSE, stimulated with phytohemagglutinin and cultured for 7 days (see section "Materials and Methods"). Medians (horizontal lines), interquartile ranges (rectangles), and 10-90% intervals (vertical segments) are shown. ***, $p < 0.001$ (one-way ANOVA with post hoc comparisons using Tukey's test).

лимфоцитов была сопоставима с таковой в пробах, не подвергавшихся процедуре «отдых». Вместе с тем нами был выявлен негативный эффект прекультивирования клеток на количество дочерних поколений, формируемых стимулированными CD4⁺ и CD8⁺Т-лимфоцитами. Более того, дополнительный «отдых» клеток существенно увеличивал относительное число Т-лимфоцитов, гибнущих в процессе деления. Важно отметить, что данный феномен был обнаружен только среди CD4⁺Т-клеток, что, по-видимому, отражает

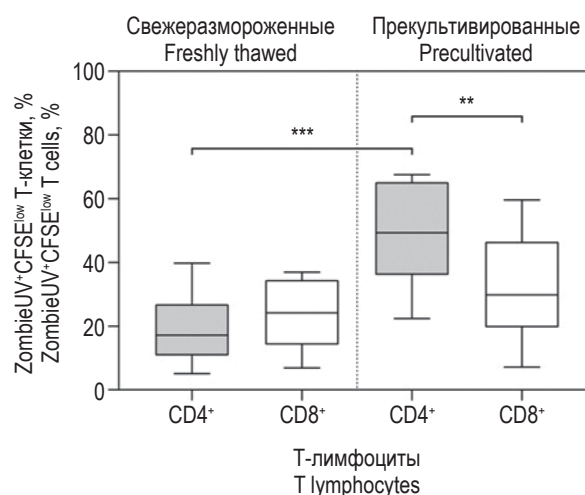


Рисунок 2. Влияние прекультивирования прошедших криоконсервацию клеток на долю гибнущих элементов среди вступивших в деление Т-лимфоцитов

Примечание. Свежезамороженные: приготовленные после разморозки клетки были окрашены CFSE, стимулированы фитогемагглютинином и культивированы в течение 7 суток. Прекультивированные: приготовленные после разморозки клетки были оставлены на 18 часов в полной питательной среде, затем окрашены CFSE, стимулированы фитогемагглютинином и культивированы в течение 7 суток (см. раздел «Материалы и методы»). Представлены медианы (горизонтальные линии), межквартильные размахи (прямоугольники) и 10-90%-ные интервалы (вертикальные отрезки). ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$ (однофакторный дисперсионный анализ с последующим сравнением с помощью критерия Тьюки).

Figure 2. Effect of cryopreserved cells precultivation on the proportion of dying elements among dividing T lymphocytes

Note. Freshly thawed: cells prepared after thawing were stained with CFSE, stimulated with phytohemagglutinin and cultured for 7 days. Precultivated: Cells prepared after thawing were left in complete culture medium for 18 hours, then stained with CFSE, stimulated with phytohemagglutinin and cultured for 7 days (see section "Materials and Methods"). Medians (horizontal lines), interquartile ranges (rectangles), and 10-90% intervals (vertical segments) are shown. **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$ (one-way ANOVA with post hoc comparisons using Tukey's test).

их большую чувствительность к гибели *in vitro* по сравнению с CD8⁺Т-лимфоцитами.

Выводы

На основании вышеизложенного можно заключить, что к проведению культуральных исследований по оценке пролиферативной способности Т-лимфоцитов, подвергавшихся длительной криоконсервации, необходимо приступать незамедлительно после разморозки клеток. Это не только значительно снижает смертность продолжительно культивируемых клеток, но и позволяет

жизнеспособным делящимся лимфоцитам давать большее количество дочерних генераций.

Благодарности

Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП «Исследование материалов и

вещества» ПФИЦ УрО РАН. Авторы выражают благодарность зав. лаборатории молекулярной иммунологии «ИЭГМ УрО РАН» д.б.н. Сайдаковой Е.В. и м.н.с. лаборатории молекулярной иммунологии «ИЭГМ УрО РАН» Пономаревой В.Н.

Список литературы / References

1. Benczik M., Gaffen S.L. The interleukin (IL)-2 family cytokines: survival and proliferation signaling pathways in T lymphocytes. *Immunol. Invest.*, 2004, Vol. 33, no. 2, pp. 109-142.
2. Browne D.J., Miller C.M., Doolan D.L. Technical pitfalls when collecting, cryopreserving, thawing, and stimulating human T-cells. *Front. Immunol.*, 2024, Vol. 15, 1382192. doi: 10.3389/fimmu.2024.1382192.
3. Capelle C.M., Ciré S., Ammerlaan W., Konstantinou M., Balling R., Betsou F., Cosma A., Ollert M., Hefeng F.Q. Standard Peripheral blood mononuclear cell cryopreservation selectively decreases detection of nine clinically relevant T cell markers. *Immunohorizons*, 2021, Vol. 5, pp. 711-720.
4. Li B., Yang C., Jia G., Liu Y., Wang N., Yang F., Su R., Shang Y., Han Y. Comprehensive evaluation of the effects of long-term cryopreservation on peripheral blood mononuclear cells using flow cytometry. *BMC Immunol.*, 2022, Vol. 23, 30. doi: 10.1186/s12865-022-00505-4.
5. Owen R.E., Sinclair E., Emu B., Heitman J.W., Hirschhorn D.F., Epling C.L., Tan Q.X., Custer B., Harris J.M., Jacobson M.A., McCune J.M., Martin J.N., Hecht F.M., Deeks S.G., Norris P.J. Loss of T cell responses following long-term cryopreservation. *J. Immunol. Methods*, 2007, Vol. 326, pp. 93-115.
6. Santos R., Buying A., Sabri N., Yu J., Gringeri A., Bender J., Janetzki S., Pinilla C., Judkowski V.A. Improvement of IFN γ ELISPOT performance following overnight resting of frozen PBMC samples confirmed through rigorous statistical analysis. *Cells*, 2014, Vol. 24, pp. 1-18.
7. Sarkar S., Kalia V., Montelaro R.C. Caspase-mediated apoptosis and cell death of rhesus macaque CD4⁺ T-cells due to cryopreservation of peripheral blood mononuclear cells can be rescued by cytokine treatment after thawing. *Cryobiology*, 2003, Vol. 47, no. 1, pp. 44-58.
8. Wang L., Hückelhoven A., Hong J., Jin N., Mani J., Chen B.A., Schmitt M., Schmitt A. Standardization of cryopreserved peripheral blood mononuclear cells through a resting process for clinical immunomonitoring – Development of an algorithm. *Cytometry A*, 2016, Vol. 89, pp. 246-258.
9. Zhang J., Yin Z., Liang Z., Bai Y., Zhang T., Yang J., Li X., Xue L. Impacts of cryopreservation on phenotype and functionality of mononuclear cells in peripheral blood and ascites. *J. Transl. Intern. Med.*, 2024, Vol. 12, no. 1, pp. 51-63.

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), Researcher, Laboratory of Ecological Immunology, Institute of Ecology and Genetics 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 Genetics of Microorganisms, Perm Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation

Поступила 18.03.2025

Отправлена на доработку 18.03.2025

Принята к печати 25.05.2025

Received 18.03.2025

Revision received 18.03.2025

Accepted 25.05.2025

ВЛИЯНИЕ ЭКСТРАКТА ФАБРИЦИЕВОЙ БУРСЫ ПТИЦ НА ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ КРОВИ МЫШЕЙ ЛИНИИ C57Bl/6 С ЦИКЛОФОСФАМИД-ИНДУЦИРОВАННЫМ ИММУНОДЕФИЦИТОМ

Кольберг Н.А.^{1,2}, Мухлынина Е.А.², Кобелев Ю.Г.³, Данилова И.Г.²

¹ ФГБОУ ВО «Уральский государственный экономический университет», г. Екатеринбург, Россия

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

³ ФГБОУ ВО «Уральский государственный юридический университет имени В.Ф. Яковлева», г. Екатеринбург,
Россия

Резюме. Циклофосфамид достаточно широко используется для лечения онкологических и аутоиммунных заболеваний. При этом одним из негативных побочных эффектов его применения является развитие миелодепрессии и лейкопении. Ряд веществ природного и синтетического происхождения способны уменьшать отрицательные эффекты циклофосфамида. Известны благоприятные эффекты антиоксидантов на показатели красного костного мозга при совместном использовании с циклофосфамидом. Интерес представляют также пептидные препараты, полученные из растительного и животного сырья, благодаря их низкой токсичности, биологической активности широкого спектра действия. Биорганоконкомплекс «Бурсанатал» благодаря содержанию активных пептидов, ростовых факторов, цитокинов, антиоксидантов также имеет перспективы использования в качестве иммуномодулятора, и ранее показал положительное влияние на показатели гуморального иммунитета при инфекционных заболеваниях различного генеза у сельскохозяйственных животных. Цель исследования — изучение действия биорганоконкомплекса «Бурсанатал» на иммунологические показатели крови у мышей C57Bl/6 с циклофосфамид-индуцированным подавлением иммунитета. Экстракт фабрициевой сумки был получен от цыплят-бройлеров возраста 35-42 дня методом гомогенизации в водно-солевом буфере и последующим удалением термолабильной фракции. Конечный продукт содержит биологически активные вещества с молекулярной массой от 1 до 10 кДа. Животным моделировали иммунодефицит путем однократной инъекции циклофосфамида (200 мг/кг массы тела). Экспериментальная группа мышей внутрибрюшинно получала экстракт бursy в течение 7 дней (0,1 мл/20 мг массы животного). Через 7 дней у мышей проводили оценку массы тела, гематологических показателей периферической крови, а также выполняли анализ субпопуляций Т- и В-лимфоцитов при помо-

Адрес для переписки:

Мухлынина Елена Артуровна
ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии»
Уральского отделения Российской академии наук
620078, Россия, г. Екатеринбург,
ул. Первомайская, 106.
Тел./факс: 8 (343) 374-00-70.
E-mail: elena.mukhlynina@yandex.ru

Address for correspondence:

Elena A. Mukhlynina
Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch,
Russian Academy of Sciences
106 Pervomayskaya St
Ekaterinburg
620078 Russian Federation
Phone/fax: +7 (343) 374-00-70.
E-mail: elena.mukhlynina@yandex.ru

Образец цитирования:

Н.А. Кольберг, Е.А. Мухлынина, Ю.Г. Кобелев,
И.Г. Данилова «Влияние экстракта фабрициевой бursy
птиц на иммунологические показатели крови мышей
линии C57Bl/6 с циклофосфамид-индуцированным
иммунодефицитом» // Российский иммунологический
журнал, 2025. Т. 28, № 3. С. 431-436.
doi: 10.46235/1028-7221-17175-EOE

© Кольберг Н.А. и соавт., 2025

Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

N.A. Kolberg, E.A. Mukhlynina, Yu.G. Kobelev, I.G. Danilova
“Effect of extract from bursa Fabricii on immunological
parameters of blood in C57Bl/6 mice with cyclophosphamide-
induced immunodeficiency”, Russian Journal of Immunology/
Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2025, Vol. 28, no. 3,
pp. 431-436.
doi: 10.46235/1028-7221-17175-EOE

© Kolberg N.A. et al., 2025

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

DOI: 10.46235/1028-7221-17175-EOE

щи проточной цитометрии. Развитие экспериментального иммунодефицита подтверждено данными гематологического анализа и проточной цитометрии: у мышей развивается лимфопения, которая в большей степени затрагивает В-клеточное звено. При этом после введения биоорганоконцентра в периферической крови мышей C57Bl/6 отмечается увеличение абсолютного и относительного содержания В-лимфоцитов относительно контрольных мышей с введением циклофосфамида. Наблюдается также изменение соотношения отдельных фракций Т-лимфоцитов, что отражается на их суммарной относительной концентрации в крови. Полученные данные позволяют говорить об отсутствии выраженного иммунотоксического действия исследуемого препарата на животных. Активные ингредиенты экстракта фабрициевой сумки являются хорошими кандидатами для альтернативной адъювантной химиотерапии для снижения иммунотоксичности.

Ключевые слова: биоорганоконцентра «Бурсанатал», циклофосфамид, мыши C57Bl/6, иммунодефицит, Т-лимфоциты, В-лимфоциты

EFFECT OF EXTRACT FROM BURSA FABRICII ON IMMUNOLOGICAL PARAMETERS OF BLOOD IN C57Bl/6 MICE WITH CYCLOPHOSPHAMIDE-INDUCED IMMUNODEFICIENCY

Kolberg N.A.^{a, b}, Mukhlynina E.A.^b, Kobelev Yu.G.^c, Danilova I.G.^b

^a Ural State University of Economics, Ekaterinburg, Russian Federation

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

^c V. Yakovlev Ural State Law University, Ekaterinburg, Russian Federation

Abstract. Cyclophosphamide is a widely used anticancer and immunosuppressive drug. Myelodepression and leukopenia is among its negative side effects. Natural and synthetic substances are able to reduce such negative effects. Protective effects of antioxidants on bone marrow are known when used together with cyclophosphamide. Plant and animal active peptides are also of interest due to their low toxicity, broad-spectrum biological activity. The Bursanatal preparation, due to presence of active peptides, growth factors, cytokines, antioxidants is also a promising immunomodulator, which previously showed a positive effect on immune response to infectious diseases in farm animals. The aim of this study was to investigate the effect of the Bursanatal on immunological parameters in C57Bl/6 mice with cyclophosphamide-induced immunosuppression. The extract from bursa Fabricii was obtained from chickens aged 35–42 days by homogenization and subsequent removal of the heat-labile fraction. The final extract contains biologically active substances with molecular mass of 1 to 10 kDa. The immunodeficient condition was induced with single injection of cyclophosphamide (200 mg/kg body weight). The experimental group of mice received bursa extract intraperitoneally for 7 days (0.1 mL/20 mg body mass). Seven days later, the mice were weighted, and blood counts were performed using hematological analyzer and flow cytometry (T and B lymphocyte subpopulations). The cyclophosphamide-treated mice developed B cell lymphopenia. After exposure to the bioorganocomplex, an increase in B cell counts was observed in peripheral blood compared to the intact controls. A changed ratio of T lymphocyte subpopulations in peripheral blood was also observed. The obtained data allow to suggest the absence of a pronounced immunotoxic effect of the Bursanatal. Moreover, the active components of the extract may be considered good candidates for alternative adjuvant chemotherapy in order to reduce immunotoxicity.

Keywords: Bursanatal, bioorganocomplex, cyclophosphamide, C57Bl/6 mice, immunodeficiency, T lymphocytes, B lymphocytes

Работа выполнена в рамках государственного задания ИИФ УрО РАН (регистрационный номер темы 122020900136-4) с использованием научного оборудования ЦКП ИИФ УрО РАН.

Введение

Циклофосфамид (ЦФА) является препаратом алкилирующего действия, который использу-

ется для химиотерапевтического лечения онкологических и ряда аутоиммунных заболеваний. Цитотоксическое действие ЦФА проявляется в повреждении ДНК за счет ее алкилирования, что усиливает индукцию апоптоза клеток. Иммуносупрессивное действие препарата, связанное с ингибированием пролиферации клеток миелоидного ростка костного мозга, является ограни-

чивающим фактором использования препарата в клинической практике. Молекулярные механизмы токсичности связаны с изменением передачи сигнала по основным сигнальным путям, включая Nrf2, NF- κ B, MAPK/ERK и АКТ. Ряд веществ природного и синтетического происхождения способны уменьшать токсичность ЦФА, оказывая защитное действие, восстанавливая нарушенные сигнальные пути [4, 5]. Доказано, что использование антиоксидантов совместно с ЦФА значительно снижает цитотоксическое действие препарата на костный мозг [3]. В настоящее время значительное внимание фармакологов привлекают пептиды, полученные из растительного и животного сырья. Преимуществом экстрагируемых пептидов является их низкая токсичность, низкое количество побочных эффектов, биологическая активность широкого спектра действия [3]. Биорганоконкомплекс, полученный из фабрициевой сумки цыплят-бройлеров возраста 35-45 дней, имеет широкие перспективы в лечении иммунносупрессивных состояний. Это связано с тем, что в экстракте бursы содержится большое количество низкомолекулярных пептидов, ростовых факторов, цитокинов, антиоксидантов и ряда других биологически активных веществ. Исследования, проведенные на сельскохозяйственных животных (телята, птицы), выявили, что экстракт бursы обладает иммуномодулирующим действием, поскольку вызывает усиление гуморального иммунитета при инфекционных заболеваниях различного генеза [1].

Цель исследования — изучение действия биорганоконкомплекса «Бурсанатал», полученного из экстракта бursы птицы, на иммунологические показатели крови мышей с циклофосамид-индуцированным подавлением иммунитета.

Материалы и методы

Для получения экстракта бursы фабрициеву сумку цыплят бройлеров возраста 35-42 дня измельчали, гомогенизировали в водно-солевом растворе с последующей экстракцией и удалением термолабильной фракции. Конечный продукт содержит биологически активные вещества с молекулярной массой от 1 до 10 кДа [2].

Эксперимент проводили на 18 самцах мышей линии C57Bl/6 весом 18-22 г. Животных содержали в одинаковых условиях вивария при контролируемой температуре (22 ± 2 °C) и влажности ($50 \pm 10\%$) при соотношении световой и темновой фаз суток 12 часов : 12 часов и свободном доступе к воде и корму. На работу с животными было получено разрешение этического комитета ИИФ УрО РАН.

Были сформированы 3 группы животных: 1. Контрольная группа мышей ($n = 6$), которой вводили физиологический раствор; 2. Животные

($n = 6$), которым моделировали иммунодефицит (ЦФА) путем введения ЦФА (Эндоксан®, Baxter Oncology GmbH, Германия) однократно внутрибрюшинно в дозе 200 мг/кг массы тела животного в виде раствора со стерильным хлоридом натрия 0,9% в концентрации 20 мг/мл; 3. Животные ($n = 6$), которым на фоне моделирования иммунодефицита внутрибрюшинно вводили экстракт бursы (ЦФА + «Бурсанатал») на протяжении 7 дней внутрибрюшинно в дозе 0,1 мл/20 мг массы животного. Для расчета дозы препарата проводили замер массы животных до воздействия.

Мышей выводили из эксперимента через 7 суток под наркозом (за 15-20 минут до эвтаназии вводился 2% «Ксилазин» (1 мл/кг) и «Золетил-100» (0,3 мл/кг) внутримышечно). Проводили замеры массы тела, забор крови из бедренной вены в пробирку с КЗ-ЭДТА для проведения гематологического анализа и проточной цитофлуорометрии. Анализ периферической крови проводили на автоматизированном гематологическом анализаторе Celly 70 (Biocode Hycel), предназначенном для исследования крови животных. Оценку клеточного звена иммунной системы мышей C57BL/6 проводили при помощи проточного цитофлуориметра Cytomics FC500 (Beckman Coulter, США) и программного обеспечения CXP Cytometer (Beckman Coulter, США). Калибровку прибора выполняли путем оценки стандартизированных флуоресцентных частиц (Flow-Check Fluorospheres (Beckman Coulter, США)). Для окрашивания проб крови применяли моноклональные антитела фирм Invitrogen (США) и BioLegend (США). Процесс пробоподготовки и окрашивания производился согласно прилагаемым производителями инструкций. Применены флуоресцентные красители — FITC, PE, PC5, PC7. В четырехцветном анализе детектировались следующие кластеры дифференцировки: CD45, CD3, CD19, CD49, CD4, CD8, CD5, CD27. Лизис эритроцитов выполняли по безотмывочной технологии с использованием реагентов OptiLyse C (Beckman Coulter, США).

Статистический анализ данных выполнен в пакете статистических программ STATISTICA 6.0 (StatSoft, Inc. 2001). Данные представлены в виде медианы (Me), верхнего и нижнего квартилей ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$), а также среднего арифметического (M) и ошибки среднего (m). Для проверки гипотезы об однородности двух независимых выборок использовали непараметрический критерий Манна-Уитни (Mann-Whitney U test). При проверке статистических гипотез использовали 5%-ный уровень значимости.

Результаты и обсуждение

Масса мышей C57Bl/6 в контрольной группе не изменилась после введения физраствора, но

уменьшилась примерно в 1,1 раза через 7 дней после введения ЦФА, что может быть вызвано с его цитотоксическим действием.

Введение ЦФА мышам C57Bl/6 сопровождалось уменьшением абсолютного и относительного количества лимфоцитов крови почти в 2 раза по сравнению с показателями контрольной группы (табл. 1). В то же время общее количество лейкоцитов не изменялось, так как отмечалось пропорциональное увеличение моноцитов, гранулоцитов, эозинофилов и базофилов. Абсолютная и относительная лимфопения после действия ЦФА подтверждает формирование экспериментального иммунодефицитного состояния и соответствует выбранной экспериментальной модели. Введение экстракта бursy существенно не повлияло на показатели белой крови у животных группы ЦФА + Бурсанатал.

У мышей линии C57Bl/6 в ответ на введение ЦФА через 7 суток в периферической крови отмечается Т- и В-клеточная абсолютная и относительная лимфопения (табл. 2), количество натуральных киллеров не меняется, в связи с чем их относительное содержание увеличивается. Т-клеточная лимфопения связана с обеими исследованными субпопуляциями, CD4⁺ и CB8⁺. Что касается субпопуляций В-лимфоцитов, ци-

клофосфамид-индуцированный иммунодефицит затрагивает В1-, В2-лимфоциты и В-клетки памяти. 7-дневное введение препарата «Бурсанатал» у мышей линии C57Bl/6 приводит к повышению абсолютного и относительного содержания В-лимфоцитов относительно группы ЦФА (табл. 2).

Также по сравнению с группой ЦФА увеличивается относительное содержание Т-лимфоцитов, которое, однако, не связано с реальным повышением их количества, имеет место изменение соотношения различных популяций лимфоцитов при действии препарата. Количество натуральных киллеров ниже контроля, как и в группе ЦФА. При этом доля этих клеток выше, чем у здоровых мышей, но ниже, чем в группе с иммунодефицитом без лечения. Наблюдается некоторое повышение относительного количества цитотоксических Т-клеток относительно группы с ЦФА без терапии. Статистически значимо основные субпопуляции В-клеток в группе с лечением препаратом «Бурсанатал» не отличаются от группы ЦФА. Но можно предположить, что повышение количества В-лимфоцитов преимущественно обусловлено субпопуляцией В2-клеток, ответственных за выработку антител к инфекционным агентам.

ТАБЛИЦА 1. ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ МЫШЕЙ ЛИНИИ C57Bl/6 ПОСЛЕ ВВЕДЕНИЯ ЦИКЛОФОСФАМИДА И ЭКСТРАКТА БУРСЫ, M±m

TABLE 1. HEMATOLOGICAL PARAMETERS OF PERIPHERAL BLOOD OF C57Bl/6 MICE AFTER ADMINISTRATION OF CYCLOPHOSPHAMIDE AND BURSA EXTRACT, M±m

Показатель Parameter	Контроль Control	Экспериментальный иммунодефицит (ЦФА) Experimental immunodeficiency (CPA)	Экспериментальный иммунодефицит (ЦФА + Бурсанатал) Experimental immunodeficiency (CPA + Bursanatal)
Лейкоциты, 10 ³ /мкл Leukocytes, 10 ³ /μL	4,05±0,47	4,25±1,61	6,22±0,67*
Лимфоциты, 10 ³ /мкл Lymphocytes, 10 ³ /μL	3,21±0,36	1,37±0,43*	1,48±0,26*
Средние клетки, 10 ³ /мкл Middle cells, 10 ³ /μL	0,73±0,10	2,67±1,08*	4,28±0,69*
Гранулоциты, 10 ³ /мкл Granulocytes, 10 ³ /μL	0,12±0,02	0,22±0,10	0,45±0,09*
Лимфоциты, % Lymphocytes, %	79,50±1,12	34,83±2,24*	24,17±2,06*
Средние клетки, % Middle cells, %	17,67±0,99	60,67±1,86*	68,33±1,36* **
Гранулоциты, % Granulocytes, %	2,83±0,31	4,50±0,50*	7,50±1,28*

Примечание. * – различия с контролем достоверны (U-тест Манна–Уитни, $p < 0,05$); ** – различия с группой ЦФА достоверны (U-тест Манна–Уитни, $p < 0,05$).

Note. *, significant differences with control group (Mann–Whitney U test, $p < 0.05$); **, significant differences with CPA group (Mann–Whitney U test, $p < 0.05$).

ТАБЛИЦА 2. СОДЕРЖАНИЕ ЛИМФОЦИТОВ РАЗЛИЧНЫХ СУБПОПУЛЯЦИЙ У МЫШЕЙ C57Bl/6 С ЦИКЛОФOSФАМИД-ИНДУЦИРОВАННЫМ ИММУНОДЕФИЦИТОМ ПОСЛЕ 7-ДНЕВНОГО ВВЕДЕНИЯ ПРЕПАРАТА БУРСАНАТАЛ, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

TABLE 2. CONTENT OF LYMPHOCYTES OF DIFFERENT SUBPOPULATIONS IN C57Bl/6 MICE WITH CYCLOPHOSPHAMIDE-INDUCED IMMUNODEFICIENCY AFTER 7-DAY ADMINISTRATION OF THE BURSANATAL, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

Показатель Parameter	Контроль Control	Экспериментальный иммунодефицит (ЦФА) Experimental immunodeficiency (CPA)	Экспериментальный иммунодефицит (ЦФА + Бурсанатал) Experimental immunodeficiency (CPA + Bursanatal)
Т-лимфоциты, % T cell, %	32,250 (27,300-37,900)	62,800 (59,300-75,000)*	75,950 (70,900-78,100)* **
Т-лимфоциты, 10^9/л T cell, 10^9 /L	1,384 (1,142-1,592)	0,654 (0,511-0,740)*	0,752 (0,681-0,910)*
В-лимфоциты, % B cell, %	60,400 (53,700-63,900)	5,600 (4,500-6,200)*	10,000 (6,900-10,800)* **
В-лимфоциты, 10^9/л B cell, 10^9 /L	2,268 (2,077-2,945)	0,043 (0,031-0,071)*	0,108 (0,057-0,118)* **
НК-клетки, % NK cell, %	7,900 (7,500-8,900)	28,250 (16,500-33,100)*	11,900 (10,200-22,000)* **
НК-клетки, 10^9/л NK cell, 10^9 /L	0,318 (0,261-0,410)	0,221 (0,147-0,382)	0,131 (0,094-0,157)*
CD8⁺ лимфоциты, % CD8 ⁺ cell, %	10,750 (10,200-11,800)	24,250 (23,800-24,900)*	28,500 (27,600-30,800)* **
CD8⁺ лимфоциты, 10^9/л CD8 ⁺ cell, 10^9 /L	0,449 (0,416-0,505)	0,253 (0,160-0,335)*	0,292 (0,264-0,331)*
CD4⁺ лимфоциты, % CD4 ⁺ cell, %	20,350 (16,700-23,400)	37,850 (33,300-43,500)*	45,200 (42,600-45,800)*
CD4⁺ клетки, 10^9/л CD4 ⁺ cell, 10^9 /L	0,812 (0,691-0,956)	0,359 (0,338-0,384)*	0,443 (0,404-0,533)*
В1-лимфоциты, % B1 cell, %	0,350 (0,200-0,400)	0,100 (0,000-0,200)	0,150 (0,100-0,300)
В1-лимфоциты, 10^9/л B1 cell, 10^9 /L	0,014 (0,012-0,018)	0,001 (0,000-0,002)*	0,002 (0,001-0,003)*
В-лимфоциты памяти, % B memory cell, %	0,300 (0,100-0,400)	0,000 (0,000-0,000)*	0,050 (0,000-0,100)*
В-лимфоциты памяти, 10^9/л B memory cell, 10^9 /L	0,013 (0,005-0,013)	0,000 (0,000-0,000)*	0,001 (0,000-0,001)*
В2-лимфоциты, % B2 cell, %	60,005 (53,000-63,450)	5,400 (4,420-5,860)*	9,850 (6,400-10,670)* **
В2-лимфоциты, 10^9/л B2 cell, 10^9 /L	2,244 (2,058-2,924)	0,043 (0,030-0,069)*	0,105 (0,052-0,116)*

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. As for Table 1.

Выводы

Таким образом, проведенные исследования свидетельствуют, что иммунодефицитное состояние, вызванное введением ЦФА обусловлено преимущественно уменьшением В2-лимфоцитов, роль которых в иммунном ответе связана со

специфической антителопродукцией. При этом отмечается снижение числа В1-лимфоцитов, продуцирующих естественные антитела. Также происходит снижение количества В-клеток памяти. Можно отметить небольшое снижение Т-лимфоцитов, которое происходит как за счет пропорционального уменьшения Т-хелперов

и цитотоксических клеток. У мышей линии C57Bl/6 7-дневная терапия препаратом «Бурсанатал» привела к двукратному повышению количества В-лимфоцитов преимущественно за счет продуцирующих специфические антитела клеток. В целом, полученные данные позволяют говорить об отсутствии выраженного иммунотоксического

действия исследуемого препарата у животных. Согласно результатам, мы также можем утверждать, активные ингредиенты экстракта фабрициевой сумки являются хорошими кандидатами для альтернативной адъювантной химиотерапии для снижения иммунотоксичности.

Список литературы / References

1. Кольберг Н.А., Петрова О.Г., Рубинский И.А., Марковская С.А., Молокова А.В., Мильштейн И.М., Петров Е.А., Травникова Д.А. Иммунные стимуляторы в птицеводстве и животноводстве: монография. Екатеринбург: Уральское издательство, 2012. 196 с. [Kolberg N.A., Petrova O.G., Rubinsky I.A., Markovskaya S.A., Molokova A.V., Milshteyn I.M., Petrov E.A., Travnikova D.A. Immune stimulants in poultry and livestock farming: monograph]. Ekaterinburg: Uralskoye izdatelstvo, 2012. 196 p.
2. Кольберг Н.А., Кольберг М.А., Травникова Д.А., Данилова И.Г., Мухлынина Е.А. Способ переработки Фабрициевой бursы птиц. Патент RU 2782347 C1, 26.10.2022. [Kolberg N.A., Kolberg M.A., Travnikova D.A., Danilova I.G., Mukhlynina E.A. Processing method for poultry bursa of Fabricius. Patent RU 2782347 C1, 26.10.2022].
3. Тихонов С.Л., Данилова И.Г., Тихонова Н.В., Тихонова М.С., Поповских А.Д. Характеристика и исследование антимикробной активности пептидной фракции трипсинового гидролизата молозива коров // XXI век: итоги прошлого и проблемы настоящего плюс, 2022. Т. 11, № 3 (59). С. 116-121. [Tikhonov S.L., Danilova I.G., Tikhonova N.V., Tikhonova M.S., Popovskikh A.D. Characteristics and study of the antimicrobial activity of the peptide fraction of the trypsin hydrolyzate of cow colostrum. XXI vek: itogi proshlogo i problemy nastoyashchego plyus = XXI century: Resumes of the Past and Challenges of the Present Plus, 2022, Vol. 11, no. 3 (59), pp. 116-121. (In Russ.)]
4. Liu X.D., Zhou B., Cao R.B., Feng X.L., Li X.F., Chen P.Y. Comparison of immunomodulatory functions of three peptides from the chicken bursa of Fabricius. *Regul. Pept.*, 2013, Vol. 186, pp. 57-61.
5. Tikhonov S.L., Tikhonova N.V., Tursunov Kh.Kh., Danilova I.G., Lazarev V.A. Peptides of trypsin hydrolyzate in bovine colostrum. *Food Processing: Techniques and Technology*, 2023, Vol. 53, no. 1, pp. 150-158.

Авторы:

Кольберг Н.А. — к.вет.н., доцент, директор Единого лабораторного комплекса ФГБОУ ВО «Уральский государственный экономический университет»; старший научный сотрудник лаборатории морфологии и биохимии ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук, г. Екатеринбург, Россия

Мухлынина Е.А. — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории морфологии и биохимии ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук, г. Екатеринбург, Россия

Кобелев Ю.Г. — к.м.н., доцент кафедры криминалистики ФГБОУ ВО «Уральский государственный юридический университет имени В.Ф. Яковлева», г. Екатеринбург, Россия

Данилова И.Г. — д.б.н., доцент, заведующая лабораторией морфологии и биохимии ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук, г. Екатеринбург, Россия

Authors:

Kolberg N.A., PhD (Veterinary), Director of the Unified Laboratory Complex, Ural State University of Economics; Senior Researcher, Laboratory of Morphology and Biochemistry, Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, Russian Federation

Mukhlynina E.A., PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratory of Morphology and Biochemistry, Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, Russian Federation

Kobeleev Yu.G., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Forensic Science, V. Yakovlev Ural State Law University, Ekaterinburg, Russian Federation

Danilova I.G., PhD, MD (Biology), Associate Professor, Head, Laboratory of Morphology and Biochemistry, Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, Russian Federation

Поступила 29.03.2025
Отправлена на доработку 08.04.2025
Принята к печати 25.05.2025

Received 29.03.2025
Revision received 08.04.2025
Accepted 25.05.2025

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МОДЕЛЬ СИНДРОМА ШЕГРЕНА, СОПРОВОЖДАЮЩЕГОСЯ Т-ЛИМФОЦИТОПЕНИЕЙ

Бедулева Л.В.^{1,2}, Фомина К.В.^{1,2}, Меньшикова Д.И.¹,
Терентьева О.С.¹, Юшков Д.П.¹

¹ ФГБОУ ВО «Удмуртский государственный университет», г. Ижевск, Удмуртская Республика, Россия

² ФГБУН «Удмуртский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук», г. Ижевск, Удмуртская Республика, Россия

Резюме. Синдром Шегрена (СШ) — системное аутоиммунное заболевание, характеризующееся иммуноопосредованным повреждением слюнных и слезных желез. В 5-35% (по разным данным) случаев синдром Шегрена сопровождается периферической CD3 Т-лимфоцитопенией, которая коррелирует с высокой активностью болезни и смертностью. Механизмы развития лимфоцитопении при СШ не известны. Важным инструментом в понимании механизмов развития болезней служат экспериментальные модели. Существующие модели синдрома Шегрена воспроизводят типичные для первичного СШ человека повреждения слюнных желез, включая воспаление слюнных желез и секреторную дисфункцию, но не лимфоцитопению. В настоящем исследовании синдром Шегрена вызывали у крыс Wistar иммунизацией фракцией белков с молекулярной массой 10-35 кДа, выделенной из гомогената слюнных желез мыши методом эксклюзионной хроматографии на сорбенте SepFast SEC 3-70. Крысы получили 3 внутрикожные инъекции антигена — первые две в составе ПАФ, третью — в составе НАФ, с интервалом в 1 неделю. Количество CD3, CD3CD4, CD3CD8-лимфоцитов определяли до иммунизации, спустя 5 и 9 недель после иммунизации методом проточной цитофлуориметрии. Гистологический анализ поднижнечелюстных слюнных желез провели через 12 недель после первой иммунизации. Часть парафиновых срезов слюнных желез окрашивали гематоксилином и эозином, другую — антителами к CD3 крысы для детекции лимфоцитарной инфильтрации. У 33% крыс выявлено повреждение эпителия зернистых протоков и обнаружены множественные очаги гиперплазии протокового эпителия. Лимфоцитарной инфильтрации на срезах слюнных желез, полученных спустя 12 недель после инициирующей СШ иммунизации, не выявлено, что свидетельствует о транзиторном характере вызванной аутоиммунной реакции против антигенов слюнных желез. У 50% крыс, иммунизированных белками слюнных желез мыши, выявлена хроническая CD4 и CD8 Т-лимфоцитопения. Таким образом, нами получена экспериментальная модель аутоиммунного заболевания подобного синдрому Шегрена, которая помимо повреждения слюнных желез воспроизводит хроническую CD4- и CD8-лимфоцитопению. Представленная модель синдрома Шегрена адекватна заболеванию чело-

Адрес для переписки:

Фомина Ксения Владимировна
ФГБОУ ВО «Удмуртский государственный университет»
426034, Россия, Удмуртская Республика, г. Ижевск,
ул. Университетская, 1.
Тел./факс: 8 (3412) 91-64-26.
E-mail: fomiksa@yandex.ru

Address for correspondence:

Ksenia V. Fomina
Udmurt State University
1 Universitetskaya St
Izhevsk, Udmurt Republic
426034 Russian Federation
Phone/fax: +7 (3412) 91-64-26.
E-mail: fomiksa@yandex.ru

Образец цитирования:

Л.В. Бедулева, К.В. Фомина, Д.И. Меньшикова,
О.С. Терентьева, Д.П. Юшков «Экспериментальная
модель синдрома Шегрена, сопровождающегося
Т-лимфоцитопенией» // Российский иммунологический
журнал, 2025. Т. 28, № 3. С. 437-442.
doi: 10.46235/1028-7221-17096-ЕМО

© Бедулева Л.В. и соавт., 2025
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

L.V. Beduleva, K.V. Fomina, D.I. Menshikova,
O.S. Terentieva, D.P. Yushkov "Experimental model
of Sjogren's syndrome accompanied by T lymphocytopenia",
Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii
Zhurnal, 2025, Vol. 28, no. 3, pp. 437-442.
doi: 10.46235/1028-7221-17096-ЕМО

© Beduleva L.V. et al., 2025
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.46235/1028-7221-17096-ЕМО

века, пригодна для изучения его патогенеза и может быть использована для выяснения механизма развития лимфоцитопении при синдроме Шегрена.

Ключевые слова: синдром Шегрена, экспериментальная модель, лимфоцитопения, гиперплазия протокового эпителия, слюнные железы, проточная цитофлуориметрия

EXPERIMENTAL MODEL OF SJOGREN'S SYNDROME ACCOMPANIED BY T LYMPHOCYTOPENIA

Beduleva L.V.^{a,b}, Fomina K.V.^{a,b}, Menshikova D.I.^a, Terentieva O.S.^a,
Yushkov D.P.^a

^a Udmurt State University, Izhevsk, Udmurt Republic, Russian Federation

^b Udmurt Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Izhevsk, Udmurt Republic, Russian Federation

Abstract. Sjogren's syndrome (SS) is a systemic autoimmune disease characterized by immune-mediated damage to the salivary and lacrimal glands. SS severity and mortality correlate with peripheral CD3⁺ T lymphopenia, which accompanies Sjogren's syndrome in 5-35% of cases. The mechanism underlying the development of lymphopenia in SS remains unclear. Experimental model is required to study the disease mechanisms. Sjogren's syndrome model replicates salivary gland damage typical for human primary SS, but does not reproduce lymphopenia symptoms. Sjogren's syndrome was induced in Wistar rats via intradermal immunization with 10-35 kDa proteins emulsified in CFA, followed by booster injections in CFA and in IFA on days 14 and 28, respectively. The proteins were isolated from homogenized murine salivary glands by size-exclusion chromatography on the SepFast SEC 3-70 sorbent. The numbers of CD3⁺, CD3⁺CD4⁺ and CD3⁺CD8⁺ lymphocytes were determined by flow cytometry. Histological analysis of submandibular salivary gland sections was performed 12 weeks after the initial immunization. The analysis revealed that 33% of rats developed epithelial damage of granular ducts and multiple foci of ductal epithelium hyperplasia. We suggest a transient nature of the induced autoimmune response to the salivary gland antigen since no lymphocytic infiltration was detected in histological analysis. In addition, chronic CD4⁺ and CD8⁺ T cell lymphopenia was detected in 50% of rats immunized with salivary gland proteins. Thus, we have developed an experimental model of Sjogren's syndrome, which reproduced not only salivary gland damage, but also chronic CD4 and CD8 lymphopenia. This model may serve as a valuable tool for elucidating the mechanisms underlying lymphopenia in Sjogren's syndrome

Keywords: Sjogren's syndrome, experimental model, lymphopenia, hyperplasia ductal epithelium, salivary glands, flow cytometry

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (FEWS-2024-0002).

Введение

Синдром Шегрена (СШ) — системное аутоиммунное заболевание, характеризующееся иммуноопосредованным повреждением слюнных и слезных желез, приводящим к ксеростомии и ксерофтальмии [12]. СШ может встречаться как самостоятельное заболевание (первичный СШ) или являться проявлением системной манифестации при других аутоиммунных заболеваниях (вторичный СШ), таких как системная красная волчанка (СКВ) и ревматоидный артрит (РА) [3]. При синдроме Шегрена, как и при многих других аутоиммунных заболеваниях, в тканях ми-

шенях обнаруживается инфильтрация CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитами [14], что указывает на роль Т-лимфоцитов в качестве эффекторов аутоиммунной реакции, наблюдается неспецифический хронический сиалоаденит, который характеризуется повреждением и расширением протоков, атрофией ацинусов и фиброзом [8].

У пациентов с первичным СШ в 5-35% (по разным данным) случаев встречается периферическая CD3⁺ Т-лимфоцитопения, которая коррелирует с высокой активностью СШ и смертностью [1, 2]. Анализ субпопуляций Т-клеток показал, что снижено может быть количество CD4⁺ Т-лимфоцитов, а именно наивных клеток, или одновременно и CD4⁺, и CD8⁺ Т-лимфоцитов. Снижение количества В-клеток и НК-клеток в крови при СШ также может иметь место. Меха-

низмы развития лимфоцитопении при СШ не известны.

Полезным инструментом для изучения патогенеза аутоиммунных заболеваний служат их экспериментальные модели. Существующие модели СШ воспроизводят основные повреждения и нарушения, характерные для первичного СШ человека, включая воспаление слюнных желез и секреторную дисфункцию, но не воспроизводят лимфоцитопению [10].

Мы получили экспериментальную модель аутоиммунного заболевания подобного синдрому Шегрена, которая воспроизводит не только повреждение слюнных желез, но и хроническую CD4- и CD8-лимфоцитопению, встречающуюся у пациентов с синдромом Шегрена. Представленная экспериментальная модель СШ адекватна заболеванию человека и пригодна для изучения его патогенеза, в том числе механизмов развития лимфоцитопении.

Материалы и методы

Для получения гомогената слюнных желез у белых лабораторных мышей извлекали поднижнечелюстные слюнные железы, промывали 3ФР (рН = 7,2) и протирали через сито. Полученный грубый гомогенат разводили десятью объемами холодного 3ФР и гомогенизировали в ультразвуковой ванне (40 кГц) 10 минут. Далее 20 минут гомогенизировали со стеклянным шариком на шейкере Multi-Vortex V-32 (BioSan, Латвия) при +4 °С на максимальной скорости, после чего 10 минут центрифугировали при 15000 g. Надосадок фракционировали методом эксклюзионной хроматографии на сорбенте SepFast SEC 3-70 (BioToolomics, Великобритания), элюцию проводили 3ФР, при скорости потока 1 мл/мин, фракции анализировали электрофоретически. Фракцию белков с молекулярной массой 10-35 кДа концентрировали, смешивали с полным или неполным адьювантом Фрейнда (ПАФ/НАФ) (InvivoGen, США) в соотношении 1:1 и встряхивали на шейкере до получения стойкой эмульсии. Самцы крыс Wistar (n = 6, возраст 10 недель) («Рапполово», Россия) получили 3 внутрикожные инъекции антигена (100 мкг белка/крысу) — первые две в составе ПАФ, третью — в составе НАФ, с интервалом в 1 неделю. Контрольные животные (n = 3) получили 3 инъекции 3ФР/адьювант — первые две 3ФР/ПАФ, третья — 3ФР/НАФ, с интервалом в 1 неделю. Кровь забирали у крыс из хвостовой вены перед иммунизацией и еженедельно в течение 9 недель. Количество CD3, CD3CD4, CD3CD8-лимфоцитов определяли методом проточной цитофлуориметрии. Для фенотипирования использовали антитела к CD3-PE/Elab Fluor® 594 (Elabscience, Китай), антитела

к CD4-PE/Cyanine7 (Elabscience, Китай), антитела к CD8-PE/Cyanine5.5 (Elabscience, Китай). Измерения проводили на проточном цитофлуориметре CytoFLEX Beckman Coulter. Через 12 недель после первой иммунизации белками слюнных желез крыс подвергали эвтаназии, извлекали поднижнечелюстные слюнные железы и готовили парафиновые срезы, часть из которых окрашивали гематоксилином и эозином, другую антителами к CD3 крысы (Elabscience, Китай) для детекции лимфоцитарной инфильтрации. Статистический анализ проводили с помощью GraphPad Prism 8.4.3. Для проверки нормальности данных использовался тест Шапиро—Уилка. Достоверность различий оценивалась с использованием теста повторных измерений ANOVA. Отличия считали значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Через 12 недель после инициирующей синдром Шегрена иммунизации из крыс были извлечены поднижнечелюстные слюнные железы и проведен их гистологический анализ. У 33% иммунизированных крыс выявлено повреждение эпителия зернистых протоков (рис. 1А), что визуально выявлялось в виде их расширения. Кроме того, у крыс были выявлены множественные очаги гиперплазии протокового эпителия (рис. 1А).

Обнаруженное расширение протоков входит в состав комплекса повреждений слюнной железы при СШ, объединенных под общим названием «неспецифический хронический сиалоаденит» [8], и обнаруживается у 48% больных синдромом Шегрена [9], а гиперплазия эпителия протоков является одним из показателей лимфоэпителиальных поражений, характерных для 33% больных СШ [8, 9]. Следовательно, изменения, найденные в слюнных железах крыс, иммунизированных белками слюнных желез мышей, подобны изменениям при СШ.

Лимфоцитарная инфильтрация слюнных желез крыс отсутствовала. Наличие разрушений эпителия зернистых протоков и гиперплазии протокового эпителия при отсутствии инфильтрации, изученной спустя 12 недель после индукции СШ, указывает на то, что аутоиммунная реакция против антигенов слюнных желез носила транзиторный характер, и к 12-й неделе завершилась.

Как отмечалось выше, первичный СШ может сопровождаться периферической лимфоцитопенией.

Анализ количества лимфоцитов, CD3, CD3CD4, CD3CD8-клеток в периферической крови крыс с индуцированным СШ выявил CD4 и CD8 Т-лимфоцитопению у 50% крыс, иммунизированных белками слюнных желез (рис. 1В). В отличие

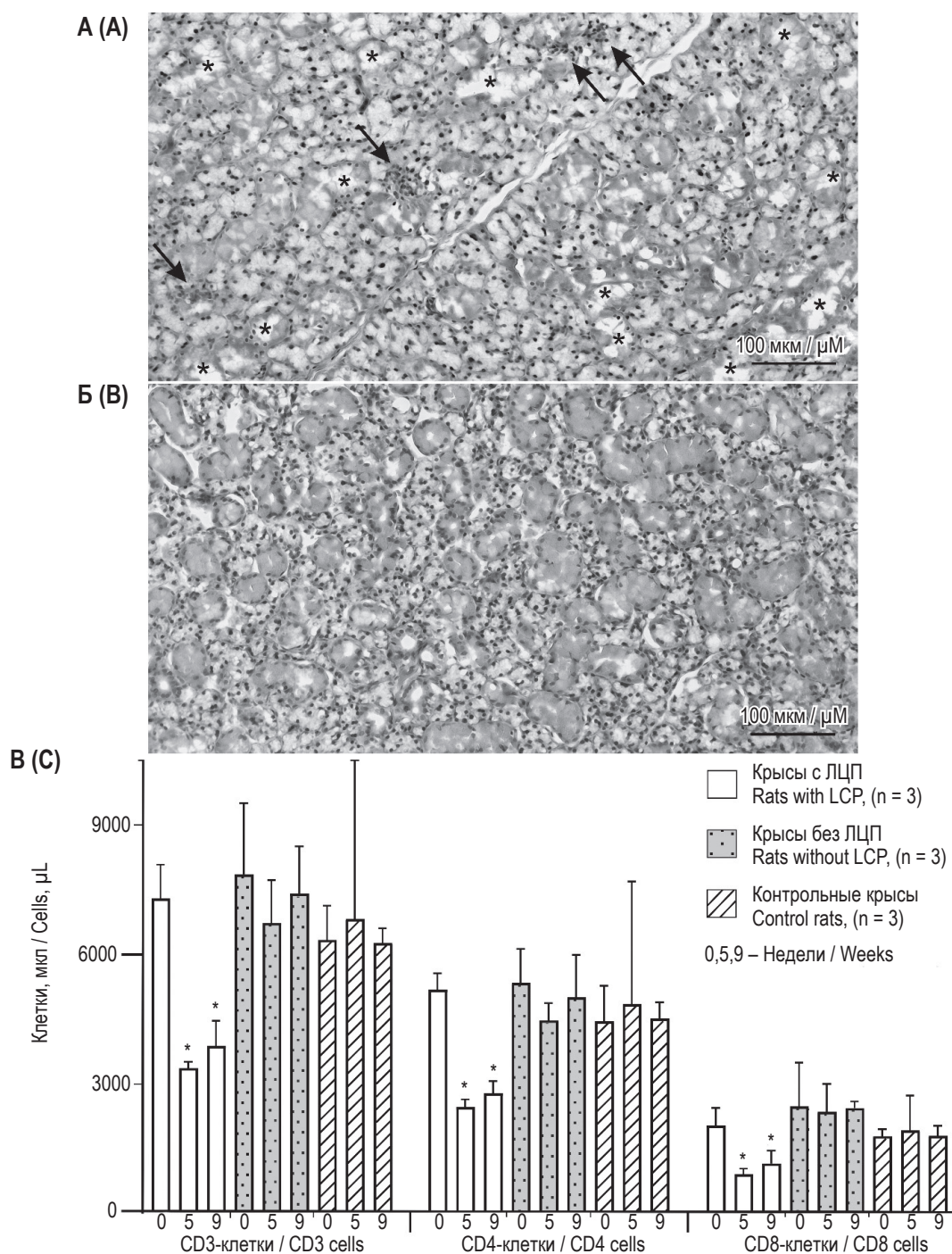


Рисунок 1. Изменения у крыс с индуцированным синдромом Шегрена

Примечание. А, Б – поперечные срезы поднижнечелюстных слюнных желез крыс, иммунизированных белками, выделенными из гомогената слюнных желез мыши. А – слюнная железа с очагами гиперплазии (стрелки), разрушением протокового эпителия и расширением протоков (звездочки); Б – слюнная железа без повреждений. Окраска H&E. В – количество CD3, CD3CD4, CD3CD8-лимфоцитов в крови крыс, иммунизированных белками, выделенными из гомогената слюнных желез мыши. Данные представлены как среднее ($n = 3$) $\pm$ SD. * – статистически значимо по отношению к значению до иммунизации (тест повторных измерений ANOVA test, $p < 0,05$). ЛЦП – лимфоцитопения.

Figure 1. Rat model of Sjogren's syndrome

Note. A, B, cross sections of the submandibular salivary glands of rats immunized with proteins isolated from mouse salivary gland homogenate. H&E staining. A, salivary gland with foci of hyperplasia (arrows), destruction of the ductal epithelium and dilation of the ducts (asterisks); B, salivary gland without damage. C, peripheral blood CD3, CD3CD4, CD3CD8 lymphocyte counts in rats immunized with proteins isolated from mouse salivary gland homogenate. The data are presented as mean ($n = 3$) $\pm$ SD. *, statistically significant in relation to pre-immunization level (ANOVA test, repeated measures, $p < 0.05$). LCP, lymphocytopenia.

от реакции против эпителия слюнных желез, которая была транзиторной, Т-лимфоцитопения носила хронический характер. Самое глубокое снижение количества CD4 и CD8-лимфоцитов найдено у крысы, характеризующейся сильным повреждением зернистых протоков.

Таким образом, вызванный у крыс Wistar синдром Шегрена воспроизводит не только повреждение слюнных желез, но и хроническую лимфоцитопению, в том числе CD4 и CD8-лимфоцитопению.

Лимфопенией нередко сопровождаются не только синдром Шегрена, но и другие аутоиммунные заболевания человека, такие как инсулин-зависимый сахарный диабет, РА, СКВ, анкилозирующий спондилит и целиакия [7]. Известен также редкий клинический синдром, получивший название идиопатическая CD4-лимфоцитопения, критериями которой являются истощение CD4 Т-лимфоцитов (абсолютный уровень Т-лимфоцитов CD4 < 300 клеток/мкл или < 20% от общего числа лимфоцитов как минимум в двух отдельных временных точках с интервалом не менее 6 недель) и как следствие СПИД-подобный синдром в отсутствие ВИЧ-инфекции или определенного иммунодефицита, или терапии, вызывающей снижение количества CD4 Т-клеток [16]. Среди пациентов с синдромом идиопатической CD4-лимфоцитопении распространены различные аутоиммунные заболевания, включая СКВ, болезнь Грейвса, антифосфолипидный синдром, аутоиммунная гемолитическая анемия, псориаз, витилиго, язвенный колит, аутоиммунный тиреоидит [4, 16], и их следует рассматривать как часть этого синдрома [4]. Лимфоцитопения при аутоиммунных заболеваниях является серьезной проблемой, усугубляет течение болезни и ослож-

няет назначение лечения, так как требует отмены иммуносупрессантов. Механизмы развития лимфоцитопении и причинно-следственные связи между лимфоцитопенией и аутоиммунным заболеванием не ясны. При идиопатической CD4-лимфоцитопении выявлены аутоантитела против CD4 Т-клеток, в том числе связанные с поверхностью CD4-лимфоцитов [5, 13, 15], что предполагает аутоиммунную природу идиопатической CD4-лимфоцитопении. Некоторые авторы рассматривают лимфоцитарную недостаточность как причину развития аутоиммунного заболевания [7]. Предполагается, что лимфопения способствует гомеостатической пролиферации Т-лимфоцитов, направленной на поддержание размера популяции клеток, что может сопровождаться потерей разнообразия Т-клеточных рецепторов и увеличением количества аутореактивных эффекторных Т-клеток [6, 11].

Полученная нами экспериментальная модель может быть полезна для изучения феномена лимфоцитопении при синдроме Шегрена, выяснения механизма его развития и испытания средств терапии.

Заключение

Таким образом, нами получена новая экспериментальная модель аутоиммунного заболевания подобного синдрому Шегрена. В отличие от существующих экспериментальных моделей СШ, новая модель воспроизводит не только повреждение слюнных желез, но и хроническую лимфоцитопению в том числе CD4- и CD8-лимфоцитопению, встречающуюся у пациентов с синдромом Шегрена. Модель может быть использована для изучения патогенеза СШ, в том числе механизмов развития лимфоцитопении.

Список литературы / References

1. Aoki A., Ohno S., Ueda A., Ideguchi H., Ohkubo T., Hagiwara E., Shirai A., Oketani M., Nagaoka S., Senuma A., Ohota S., Matsunaga K., Ishigatsubo Y. Hematological abnormalities of primary Sjogren's syndrome. *Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi*, 2000, Vol. 23, no. 2, pp. 124-128. (In Japanese)
2. Brito-Zerón P., Kostov B., Solans R., Fraile G., Suárez-Cuervo C., Casanovas A., Rascón F.J., Qanneta R., Pérez-Alvarez R., Ripoll M., Akasbi M., Pinilla B., Bosch J.A., Nava-Mateos J., Díaz-López B., Morera-Morales M.L., Gheitasi H., Retamozo S., Ramos-Casals M.; SS Study Group, Autoimmune Diseases Study Group (GEAS), Spanish Society of Internal Medicine (SEMI). Systemic activity and mortality in primary Sjögren syndrome: predicting survival using the EULAR-SS Disease Activity Index (ESSDAI) in 1045 patients. *Ann. Rheum. Dis.*, 2016, Vol. 75, no. 2, pp. 348-355.
3. Chiorini J.A., Cihakova D., Ouellette C.E., Caturegli P. Sjögren syndrome: advances in the pathogenesis from animal models. *J. Autoimmun.*, 2009, Vol. 33, no. 3-4, pp. 190-196.
4. Cudrici C.D., Boulougoura A., Sheikh V., Freeman A., Sortino O., Katz J.D., Sereti I., Siegel R.M. Characterization of autoantibodies, immunophenotype and autoimmune disease in a prospective cohort of patients with idiopathic CD4 lymphocytopenia. *Clin. Immunol.*, 2021, Vol. 224, 108664. doi: 10.1016/j.clim.2021.108664.
5. Henriksson G., Manthorpe R., Bredberg A. Antibodies to CD4 in primary Sjögren's syndrome. *Rheumatology (Oxford)*, 2000, Vol. 39, no. 2, pp. 142-147.
6. Khoruts A., Fraser J.M. A causal link between lymphopenia and autoimmunity. *Immunol. Lett.*, 2005, Vol. 98, no. 1, pp. 23-31.

7. King C., Ilic A., Koelsch K., Sarvetnick N. Homeostatic expansion of T cells during immune insufficiency generates autoimmunity. *Cell*, 2004, Vol. 117, no. 2, pp. 265-277.
8. Liao R., Yang H.T., Li H., Liu L.X., Li K., Li J.J., Liang J., Hong X.P., Chen Y.L., Liu D.Z. Recent advances of salivary gland biopsy in Sjögren's syndrome. *Front. Med. (Lausanne)*, 2022, Vol. 8, 792593. doi: 10.3389/fmed.2021.792593.
9. Llamas-Gutierrez F.J., Reyes E., Martínez B., Hernández-Molina G. Histopathological environment besides the focus score in Sjögren's syndrome. *Int. J. Rheum. Dis.*, 2014, Vol. 17, no. 8, pp. 898-903.
10. Mieliauskaitė D., Kontenis V., Šiaurys A. Lessons from animal models in Sjögren's syndrome. *Int. J. Mol. Sci.*, 2023, Vol. 24, no. 16, 12995. doi: 10.3390/ijms241612995.
11. Monti P., Scirpoli M., Maffi P., Ghidoli N., De Taddeo F., Bertuzzi F., Piemonti L., Falcone M., Secchi A., Bonifacio E. Islet transplantation in patients with autoimmune diabetes induces homeostatic cytokines that expand autoreactive memory T cells. *J. Clin. Invest.*, 2008, Vol. 118, no. 5, pp. 1806-1814.
12. Negrini S., Emmi G., Greco M., Borro M., Sardaneli F., Mordaca G., Indiveri F., Puppo F. Sjögren's syndrome: a systemic autoimmune disease. *Clin. Exp. Med.*, 2022, Vol. 22, no. 1, pp. 9-25.
13. Perez-Diez A., Wong C.S., Liu X., Mystakelis H., Song J., Lu Y., Sheikh V., Bourgeois J.S., Lisco A., Laidlaw E., Cudrici C., Zhu C., Li Q.Z., Freeman A.F., Williamson P.R., Anderson M., Roby G., Tsang J.S., Siegel R., Sereti I. Prevalence and pathogenicity of autoantibodies in patients with idiopathic CD4 lymphopenia. *J. Clin. Invest.*, 2020, Vol. 130, no. 10, pp. 5326-5337.
14. Ríos-Ríos W.J., Sosa-Luis S.A., Torres-Aguilar H. T cells subsets in the immunopathology and treatment of Sjögren's syndrome. *Biomolecules*, 2020, Vol. 10, no. 11, 1539. doi: 10.3390/biom10111539.
15. Salit R.B., Hankey K.G., Yi R., Rapoport A.P., Mann D.L. Detection of CD4(+) T-cell antibodies in a patient with idiopathic CD4 T lymphocytopenia and cryptococcal meningitis. *Br. J. Haematol.*, 2007, Vol. 139, no. 1, pp. 133-137.
16. Zonios D.I., Falloon J., Bennett J.E., Shaw P.A., Chait D., Baseler M.W., Adelsberger J.W., Metcalf J.A., Polis M.A., Kovacs S.B., Kovacs J.A., Davey R.T., Lane H.C., Masur H., Sereti I. Idiopathic CD4⁺ lymphocytopenia: natural history and prognostic factors. *Blood*, 2008, Vol. 112, no. 2, pp. 287-294.

Авторы:

Бедулева Л.В. — д.б.н., профессор, главный научный сотрудник лаборатории молекулярной и клеточной иммунологии ФГБОУ ВО «Удмуртский государственный университет»; ведущий научный сотрудник лаборатории биосовместимых материалов ФГБН «Удмуртский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук», г. Ижевск, Удмуртская Республика, Россия

Фомина К.В. — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории молекулярной и клеточной иммунологии ФГБОУ ВО «Удмуртский государственный университет»; старший научный сотрудник лаборатории биосовместимых материалов ФГБН «Удмуртский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук», г. Ижевск, Удмуртская Республика, Россия

Меньшикова Д.И. — инженер-исследователь лаборатории молекулярной и клеточной иммунологии ФГБОУ ВО «Удмуртский государственный университет», г. Ижевск, Удмуртская Республика, Россия

Терентьева О.С. — младший научный сотрудник лаборатории молекулярной и клеточной иммунологии ФГБОУ ВО «Удмуртский государственный университет», г. Ижевск, Удмуртская Республика, Россия

Юшков Д.П. — инженер-исследователь лаборатории молекулярной и клеточной иммунологии ФГБОУ ВО «Удмуртский государственный университет», г. Ижевск, Удмуртская Республика, Россия

Authors:

Beduleva L.V., PhD, MD (Biology), Professor, Chief Researcher, Laboratory of Molecular and Cell Immunology, Udmurt State University; Leading Researcher, Laboratory of Biocompatible Materials, Udmurt Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Izhevsk, Udmurt Republic, Russian Federation

Fomina K.V., PhD (Biology), Senior Researcher Laboratory of Molecular and Cell Immunology, Udmurt State University; Senior Researcher, Laboratory of Biocompatible Materials, Udmurt Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Izhevsk, Udmurt Republic, Russian Federation

Menshikova D.I., Research Engineer, Laboratory of Molecular and Cell Immunology, Udmurt State University, Izhevsk, Udmurt Republic, Russian Federation

Terentieva O.S., Junior Researcher, Laboratory of Molecular and Cell Immunology, Udmurt State University, Izhevsk, Udmurt Republic, Russian Federation

Yushkov D.P., Research Engineer, Laboratory of Molecular and Cellular Immunology, Udmurt State University, Izhevsk, Udmurt Republic, Russian Federation

Поступила 22.02.2025

Отправлена на доработку 05.03.2025

Принята к печати 01.05.2025

Received 22.02.2025

Revision received 05.03.2025

Accepted 01.05.2025

РЕГУЛЯТОРНЫЙ РЕВМАТОИДНЫЙ ФАКТОР В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МОДЕЛИ СИНДРОМА ШЕГРЕНА У КРЫС

Иванов П.В.¹, Сидоров А.Ю.^{1,2}, Терентьев А.С.^{1,2}, Черепанов И.С.¹

¹ ФГБОУ ВО «Удмуртский государственный университет», г. Ижевск, Удмуртская Республика, Россия

² ФГБУН «Удмуртский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук», г. Ижевск, Удмуртская Республика, Россия

Резюме. Ранее нами был обнаружен новый фактор регуляции аутореактивности, получивший название регуляторный ревматоидный фактор (регРФ). Он представлен популяцией антиидиотипических антител, которые объединяет наличие общего паратопа, специфичного к PD1-молекуле. РегРФ оказывает цитотоксическое действие на активированные PD-1⁺CD4 Т-лимфоциты, посредством которого контролирует экспансию лимфоцитов. Было замечено, что продукция регРФ в период индукции таких экспериментальных аутоиммунных заболеваний, как коллаген-индуцированный артрит, экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит и атеросклероз крыс, предотвращает развитие заболевания. Ассоциация между регРФ и устойчивостью к развитию заболевания предполагает, что стимуляция продукции регРФ может быть эффективным средством лечения данных аутоиммунных заболеваний, чему были получены экспериментальные доказательства. Синдром Шегрена (СШ) – аутоиммунное заболевание, сопровождающее другие аутоиммунные заболевания или возникающее самостоятельно. При СШ поражаются слюнные железы (СЖ) и может развиваться лимфоцитопения. Является ли регРФ фактором устойчивости крыс к развитию СШ и может ли быть использована стимуляция продукции регРФ для лечения СШ, неизвестно. Целью данной работы было выяснение роли регРФ в обеспечении устойчивости крыс к развитию СШ. СШ индуцировали у крыс Wistar иммунизацией белками, выделенными из СЖ мыши. Ежедневно до и после иммунизации забирали кровь из хвостовой вены. Гистологический анализ поднижнечелюстных СЖ проводили через 12 недель после первой иммунизации. В сыворотке крови определяли уровень регРФ методом пассивной гемагглютинации таннизированных нагруженных IgG эритроцитов, а также уровень аутоантител к CD4 методом ИФА. В крови измеряли количество CD3⁺, CD4⁺ и CD8⁺ лимфоцитов методом проточной цитометрии. У 40% крыс иммунизированных белками СЖ мыши выявлены повреждения СЖ, характерные для неспецифического хронического сиалоаденита, развивающегося при СШ. У 50% крыс в ответ на иммунизацию белками СЖ мыши развивалась хроническая CD3, CD4 и CD8-лимфоцитопения. Аутоантитела к CD4 у крыс с CD4-лимфоцитопенией найдены не были. Выявлена ассоциация между высоким уровнем регРФ на 7-й день после иммунизации белками СЖ мыши и устойчивостью крыс

Адрес для переписки:

Иванов Павел Владимирович
ФГБОУ ВО «Удмуртский государственный университет»
426034, Россия, Удмуртская Республика, г. Ижевск,
ул. Университетская, 1.
Тел./факс: 8 (3412) 91-64-26.
E-mail: aka.ven1k@gmail.com

Address for correspondence:

Pavel V. Ivanov
Udmurt State University
1 Universitetskaya St
Izhevsk, Udmurt Republic
426034 Russian Federation
Phone/fax: +7 (3412) 91-64-26.
E-mail: aka.ven1k@gmail.com

Образец цитирования:

П.В. Иванов, А.Ю. Сидоров, А.С. Терентьев,
И.С. Черепанов «Регуляторный ревматоидный фактор
в экспериментальной модели синдрома Шегрена у крыс»
// Российский иммунологический журнал, 2025. Т. 28,
№ 3. С. 443–448.
doi: 10.46235/1028-7221-17134-RRF

© Иванов П.В. и соавт., 2025

Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

P.V. Ivanov, A.Yu. Sidorov, A.S. Terentiev, I.S. Cherepanov
“Regulatory rheumatoid factor in rat model of Sjogren’s
syndrome”, Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy
Immunologicheskii Zhurnal, 2025, Vol. 28, no. 3, pp. 443–448.
doi: 10.46235/1028-7221-17134-RRF

© Ivanov P.V. et al., 2025

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

DOI: 10.46235/1028-7221-17134-RRF

к сиалоадениту. Однако развитие лимфоцитопении не зависело от продукции регРФ в период индукции СШ. Таким образом, регРФ является фактором устойчивости крыс к развитию сиалоаденита, но не лимфоцитопении в модели СШ.

Ключевые слова: синдром Шегрена, ревматоидный фактор, лимфоцитопения, иммунорегуляция, аутоантитела, Т-лимфоциты

REGULATORY RHEUMATOID FACTOR IN RAT MODEL OF SJOGREN'S SYNDROME

Ivanov P.V.^a, Sidorov A.Yu.^{a, b}, Terentiev A.S.^{a, b}, Cherepanov I.S.^a

^a Udmurt State University, Izhevsk, Udmurt Republic, Russian Federation

^b Udmurt Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Izhevsk, Udmurt Republic, Russian Federation

Abstract. Earlier, we have revealed a novel factor regulating autoreactivity called regulatory rheumatoid factor (regRF), which is represented by a population of anti-idiotypic antibodies that have a common paratope specific to the PD1 molecule. RegRF exerts cytotoxic effect on activated PD-1⁺CD4 T lymphocytes and controls the lymphocyte expansion. Its production during the induction period prevents experimental autoimmune diseases in rats. The association between regRF and resistance to these disorders suggests that regRF stimulation may be an effective treatment of autoimmune diseases. Sjogren's syndrome (SS) is an autoimmune disease that may accompany other autoimmune diseases or occur independently. Salivary gland (SG) lesions and lymphocytopenia may develop in SS. It is not known whether the regRF is a resistance factor to SS, and if the regRF stimulation may be used to treat this condition. The aim of this study was to clarify the role of regRF in ensuring resistance to Sjogren's syndrome in rats. SS was induced in Wistar rats by immunization with proteins isolated from murine SG. Blood samples were taken from the caudal vein each week before and after the immunization. Histological analysis of submandibular SG tissue was performed 12 weeks after the initial immunization. Autoantibodies to CD4 were detected in serum by ELISA; regRF levels were measured by agglutination of IgG-coated erythrocytes; CD3⁺, CD4⁺ and CD8⁺ lymphocyte counts were determined by flow cytometry in blood samples. 40% of rats immunized with mouse SG proteins, have developed SG lesions typical of sialoadenitis occurring in Sjogren's syndrome. 50% of rats exhibited chronic lymphocytopenia (CD3, CD4 and CD8 cell populations) in response to immunization with mouse SG proteins. In rats with CD4 lymphocytopenia, no autoantibodies to CD4 have been found. An association has been found between a high level of regRF on day 7 following immunization with mouse SG proteins and resistance to sialadenitis in rats. However, lymphocytopenia did not depend on regRF production during induction of SS. Thus, regulatory rheumatoid factor is a preventive factor for sialoadenitis, but not to lymphocytopenia in rat model of Sjogren's syndrome.

Keywords: Sjogren's syndrome, rheumatoid factor, lymphocytopenia, immune regulation, autoantibodies, T lymphocytes

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (FEWS-2024-0002).

Введение

Регуляторный ревматоидный фактор (регРФ) — популяция антиидиотипических антител, направленных к уникальным антигенсвязывающим участкам Т- и В-клеточных рецепторов лимфоцитов. Особенностью регРФ, отличающих его от других антиидиотипических антител,

является наличие общего паратопа, специфичного к молекуле PD-1 [2], обеспечивающего механизм иммуносупрессивного действия регРФ. регРФ оказывает цитотоксическое действие на активированные PD-1-экспрессирующие CD4-лимфоциты, которые при ряде аутоиммунных заболеваний выполняют основные эффекторные функции либо активируют CD8-лимфоциты [2, 7]. В экспериментальных моделях коллаген-индуцированного артрита, аутоиммунного энцефаломиелита и атеросклероза крыс продукция регРФ в период индукции заболевания предотвращает их

развитие [1]. Стимуляции продукции регРФ Fc-фрагментами гомологичного IgG была применена для успешной терапии экспериментально-вызванных аутоиммунных заболеваний [6].

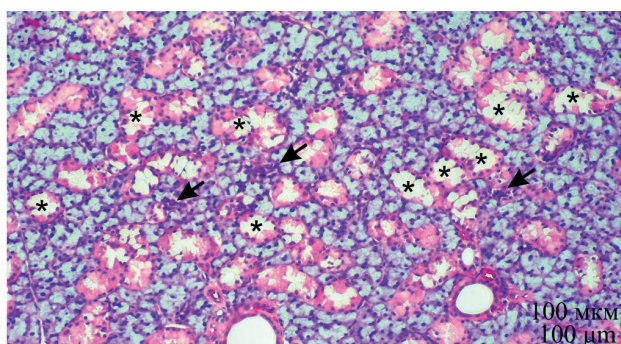
Синдром Шегрена (СШ) представляет собой хроническое системное аутоиммунное заболевание неизвестной этиологии. Как у людей, так и в экспериментальных моделях СШ характеризуется инфильтрацией и повреждением тканей слюнных желез (СЖ) CD4 Т-лимфоцитами и В-лимфоцитами [4]. Предполагается, что основными аутоиммунными мишенями при СШ являются ацинарные, вставочные и исчерченные протоковые эпителиальные клетки [9]. Примерно у 5% пациентов с СШ диагностируется идиопатическая CD4 Т-лимфоцитопения, не

связанная с иммунодефицитом или терапией, влияющей на уровень CD4 Т-клеток. Кроме CD4-лимфоцитопении, может иметь место и снижение количества CD8 Т-лимфоцитов в периферической крови [8]. Типичными серологическими показателями при СШ являются гиперглобулинемия, анти-Ro/SSA антитела – у 33-74% и анти-La/SSB антитела – у 23-52%, антинуклеарные антитела – у 59-85%, ревматоидный фактор – у 36-74% пациентов [5].

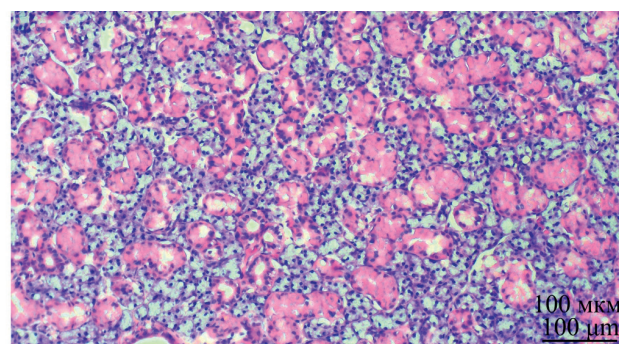
Является ли регРФ фактором устойчивости крыс к развитию СШ и может ли быть использована стимуляция продукции регРФ для лечения СШ, неизвестно.

Целью работы было выяснение роли регРФ в модели СШ.

А (А)



Б (В)



В (С)

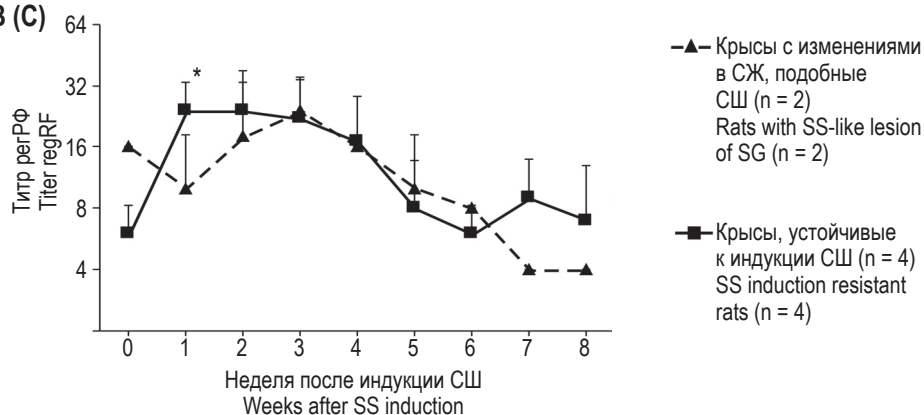


Рисунок 1. А, Б – срезы поднижнечелюстных слюнных желез крыс, иммунизированных гетерологичным гомогенатом слюнных желез мыши. А – крысы с гистопатологическими изменениями, подобными синдрому Шегрена. Б – крысы без изменений. Окраска – Н&Е. * – места разрушения эпителия зернистых протоков. Стрелки – очаги гиперплазии. В – кинетика регуляторного ревматоидного фактора у крыс с изменениями в слюнных железах, чувствительных к развитию синдрома Шегрена, и крыс без изменений в слюнных железах, резистентных к развитию синдрома Шегрена

Примечание. Каждая точка представлена как среднее $\pm$ SD. * – $p < 0,05$, критерий Манна–Уитни.

Figure 1. A, B, sections of the submandibular salivary glands of rats immunized with heterologous homogenate of mouse salivary glands. A, rats with histopathological changes similar to Sjogren's syndrome B, rats without changes. Coloring, N&E. *, sites of destruction of the epithelium of granular ducts. Arrows, foci of hyperplasia. C, kinetics of regulatory rheumatoid factor in rats with changes in salivary glands sensitive to the development of Sjogren's syndrome and rats without changes in salivary glands resistant to the development of Sjogren's syndrome.

Note. Each point is represented as the average $\pm$ SD. *, $p < 0.05$, Mann–Whitney criterion.

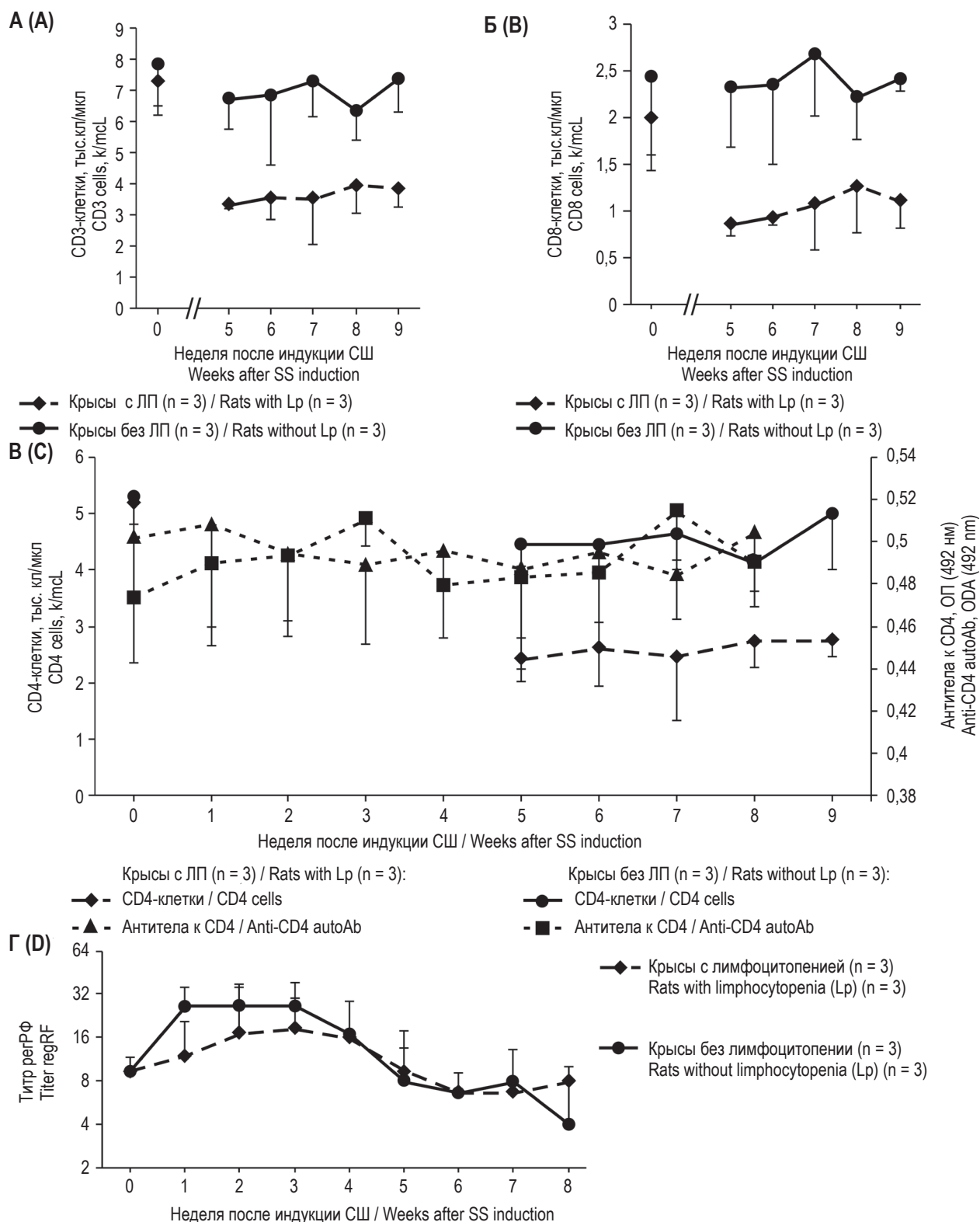


Рисунок 2. Количество CD3 Т-лимфоцитов (А), CD8 Т-лимфоцитов (Б) и CD4 Т-лимфоцитов (В) в крови крыс, иммунизированных гомогенатом слюнных желез мыши. Кинетика аутоантител к CD4 у крыс с CD4 Т-лимфоцитопенией и без нее (В). Кинетика регуляторного ревматоидного фактора у крыс с лимфоцитопенией и без нее (Г)

Примечание. Каждая точка представлена как среднее $\pm$ SD.

Figure 2. The number of CD3 T lymphocytes (A), CD8 T lymphocytes (B) and CD4 T lymphocytes (C) in the blood of rats immunized with mouse salivary gland homogenate. Kinetics of CD4 autoantibodies in rats with and without CD4 T-lymphocytopenia (B). Kinetics of regulatory rheumatoid factor in rats with and without lymphocytopenia (D)

Note. Each point is represented as the mean $\pm$ SD.

Материалы и методы

Для индукции СШ 6 крыс Wistar были иммунизированы внутривенно белками СЖ мышей (по 100 мкг белка). Крысы получили 3 инъекции с интервалом в 1 неделю, первые две в составе ПАФ, третью — в составе НАФ. 3 крысы контрольной группы получили инъекцию ПАФ. До и после иммунизации у животных еженедельно забирали кровь, определяли уровень регРФ, аутоантител к CD4, количество CD3, CD4 и CD8 Т-лимфоцитов. Через 12 недель после первой иммунизации проводили гистологический анализ подчелюстных СЖ.

Гистологические срезы готовили по стандартной методике и окрашивали гематоксилином-эозином.

Белки для иммунизации готовили из СЖ мыши, смешивали с ПАФ или НАФ в соотношении 1:1 до получения стойкой эмульсии.

Кровь забирали из хвостовой вены под легкой эфирной анестезией перед иммунизацией и еженедельно в течение всего эксперимента.

Фенотипирование лимфоцитов проводили на проточном цитофлуориметре CytoFLEX Beckman Coulter в суспензии моноклелов, выделенных из свежей крови на фиколе, после добавления к ним антител к CD3-PE/Elab Fluor® 594, к CD4-PE/Cyanine7, к CD8-PE/Cyanine5.5 (Elab-science).

РегРФ определяли в реакции пассивной геммагглютинации фиксированных танализированных нагруженных IgG-крысы эритроцитов человека.

IgG-крысы выделяли из сыворотки крови интактных крыс осаждением сульфатом аммония и эксклюзионной хроматографией.

Наличие и уровень антител к рекомбинантному CD4-белку крысы определяли методом непрямого твердофазного ИФА.

Статистический анализ проведен с использованием ПО GraphPad Prism. Различия считали значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Гистопатологические изменения в СЖ выявлены у 40% крыс. Обнаружены множествен-

ные очаги гиперплазии протокового эпителия, а также визуальное расширение зернистых протоков, что соответствует повреждению эпителия в них (рис. 1А). Выявленное увеличение просвета протоков характерно для неспецифического хронического сиалоаденита, развивающегося у пациентов с СШ [3]. Гиперплазия эпителия протоков, в свою очередь, служит показателем лимфоэпителиальных поражений, возникающих при СШ [3].

На основании гистопатологической картины крысы были разделены на две группы — с изменениями в СЖ и без изменений.

Сравнительный анализ уровня регРФ в группах с изменениями в СЖ и без изменений показал, что у животных без изменений в СЖ происходило увеличение уровня регРФ на 7-й день после иммунизации белками-индукторами СШ ($p \leq 0,05$), у крыс с изменениями в СЖ, характерными для СШ, уровень регРФ в ответ на иммунизацию не изменялся (рис. 1В). Таким образом, выявлена ассоциация между высоким уровнем регРФ в период индукции СШ и устойчивостью крыс к сиалоадениту.

У половины крыс, иммунизированных белками СЖ мыши, выявлена хроническая лимфоцитопения (рис. 2А). Снижению подверглись и CD4 и CD8 Т-лимфоциты (рис. 2Б, В). Аутоантитела к CD4 не были найдены у крыс с CD4-лимфоцитопенией (рис. 2В). Возможно, аутоиммунная атака в модели Шегрена направлена против дифференцированных антигенов Т-лимфоцитов.

Чтобы выяснить, играет ли регРФ роль в обеспечении устойчивости крыс к развитию Т-лимфоцитопении, был проведен сравнительный анализ уровня регРФ у крыс с лимфоцитопенией и без нее. Обнаружено, что развитие Т-лимфоцитопении не зависит от продукции регРФ в период индукции СШ (рис. 2Г).

Выводы

В экспериментальной модели СШ крыс продукция регРФ в период индукции заболевания предотвращает развитие неспецифического хронического сиалоаденита, но не влияет на развитие Т-лимфоцитопении у крыс.

Список литературы / References

1. Beduleva L., Menshikov I., Stolyarova E., Fomina K., Lobanova O., Ivanov P., Terentiev A. Rheumatoid factor in idiopathic regulation of autoimmunity. *Int. J. Rheum. Dis.*, 2015, Vol. 18, no. 4, pp. 408-420.
2. Khramova T., Beduleva L., Sidorov A., Terentiev A., Menshikov I. Regulatory rheumatoid factor is specific to PD-1 and Uses PD-1 pathway to control CD4 T lymphocytes. *Immunol. Invest.*, 2023, Vol. 52, no. 7, pp. 897-908.

3. Liao R., Yang H.T., Li H., Liu L.X., Li K., Li J.J., Liang J., Hong X.P., Chen Y.L., Liu D.Z. Recent advances of salivary gland biopsy in Sjögren's Syndrome. *Front. Med. (Lausanne)*, 2022, Vol. 8, 792593. doi: 10.3389/fmed.2021.792593.
4. Negrini S., Emmi G., Greco M., Borro M., Sardanelli F., Murdaca G., Indiveri F., Puppo F. Sjögren's syndrome: a systemic autoimmune disease. *Clin. Exp. Med.*, 2022, Vol. 22, no. 1, pp. 9-25.
5. Patel R., Shahane A. The epidemiology of Sjögren's syndrome. *Clin. Epidemiol.*, 2014, Vol. 6, pp. 247-255.
6. Sidorov A., Beduleva L., Menshikov I., Terentiev A., Stolyarova E., Abisheva N. Fc fragments of immunoglobulin G are an inductor of regulatory rheumatoid factor and a promising therapeutic agent for rheumatic diseases. *Int. J. Biol. Macromol.*, 2017, Vol. 95, pp. 938-945.
7. Stolyarova E., Beduleva L., Menshikov I., Snigiryev A., Khramova T. Mechanism by which regulatory rheumatoid factor prevents experimental autoimmune encephalomyelitis. *Endocr. Metab. Immune Disord. Drug Targets*, 2018, Vol. 18, no. 6, pp. 596-601.
8. Sudzius G., Mieliauskaite D., Siaurys A., Viliene R., Butrimiene I., Characiejus D., Dumalakiene I. Distribution of Peripheral Lymphocyte Populations in Primary Sjögren's Syndrome Patients. *J. Immunol. Res.*, 2015, Vol. 2015, 854706. doi: 10.1155/2015/854706.
9. Yura Y., Hamada M. Outline of salivary gland pathogenesis of Sjögren's Syndrome and current therapeutic approaches. *Int. J. Mol. Sci.*, 2023, Vol. 24, no. 13, 11179. doi: 10.1371/10.3390/ijms241311179.

Авторы:

Иванов П.В. — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории молекулярной и клеточной иммунологии ФГБОУ ВО «Удмуртский государственный университет», г. Ижевск, Удмуртская Республика, Россия

Сидоров А.Ю. — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории молекулярной и клеточной иммунологии ФГБОУ ВО «Удмуртский государственный университет»; старший научный сотрудник лаборатории биосовместимых материалов ФГБУН «Удмуртский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук», г. Ижевск, Удмуртская Республика, Россия

Терентьев А.С. — старший научный сотрудник лаборатории молекулярной и клеточной иммунологии ФГБОУ ВО «Удмуртский государственный университет»; научный сотрудник лаборатории биосовместимых материалов ФГБУН «Удмуртский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук», г. Ижевск, Удмуртская Республика, Россия

Черепанов И.С. — к.х.н., доцент кафедры фундаментальной и прикладной химии ФГБОУ ВО «Удмуртский государственный университет», г. Ижевск, Удмуртская Республика, Россия

Authors:

Ivanov P.V., PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratory of Molecular and Cell Immunology, Udmurt State University, Izhevsk, Udmurt Republic, Russian Federation

Sidorov A.Yu., PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratory of Molecular and Cell Immunology, Udmurt State University; Senior Researcher, Laboratory of Biocompatible Materials, Udmurt Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Izhevsk, Udmurt Republic, Russian Federation

Terentiev A.S., Senior Researcher, Laboratory of Molecular and Cell Immunology, Udmurt State University; Researcher, Laboratory of Biocompatible Materials, Udmurt Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Izhevsk, Udmurt Republic, Russian Federation

Cherepanov I.S., PhD (Chemistry), Associate Professor, Department of Fundamental and Applied Chemistry, Udmurt State University, Izhevsk, Udmurt Republic, Russian Federation

Поступила 25.03.2025
Отправлена на доработку 09.05.2025
Принята к печати 25.05.2025

Received 25.03.2025
Revision received 09.05.2025
Accepted 25.05.2025

РЕГУЛЯТОРНЫЙ РЕВМАТОИДНЫЙ ФАКТОР В КРОВИ КРЫС, ИММУНИЗИРОВАННЫХ АУТОЛОГИЧНЫМИ ЛИМФОЦИТАМИ, АКТИВИРОВАННЫМИ *IN VITRO* ГЕТЕРОЛОГИЧНЫМИ ЛИМФОЦИТАМИ

Кряжевских А.В., Абишева Н.Н.

ФГБУН «Удмуртский федеральный исследовательский центр» Уральского отделения Российской академии наук, г. Ижевск, Удмуртская Республика, Россия

ФГБОУ ВО «Удмуртский государственный университет», г. Ижевск, Удмуртская Республика, Россия

Резюме. Поиск подходов для решения проблем острого и хронического отторжения трансплантата, преодоления тканевой несовместимости, является одним из важных вопросов клинической трансплантологии и регенеративной медицины. Индукция толерантности к естественным и искусственным трансплантационным антигенам является желаемой целью уже не одно столетие. Недавно было показано, что антилимфоцитарные антитела к активированным лимфоцитам, названные регуляторным ревматоидным фактором (регРФ), участвуют в контроле аутореактивных лимфоцитов в норме, поддерживая естественную толерантность. Было отмечено, что относительно быстрый подъем уровня регРФ в крови (3-5-й день) после иммунизации наблюдается при аутотрансплантации. Также его раннее повышение ассоциировано с нечувствительностью животных к экспериментально вызываемым аутоиммунным заболеваниям. Целью нашего исследования было выяснить, возможно ли индуцировать продукцию регРФ у крыс введением аутологичных лимфоцитов, активированных *in vitro* гетерологичным антигеном (лимфоциты мыши). Для этого одну группу крыс иммунизировали внутривенно смешанной культурой аутологичных и гетерологичных (мышинных) лимфоцитов (СКЛ), после 5 дней совместной инкубации. Другую группу иммунизировали только лимфоцитами мыши. РегРФ в крови определяли на 3-й, 5-й, 7-й, 14-й, 21-й, 28-й и 35-й дни после иммунизации. Предполагали, что внутривенное введение крысам активированных в СКЛ аутологичных лимфоцитов крыс и лимфоцитов мышей вызовет ранний ответ регРФ на аутологичные лимфоциты и более поздний на гетерологичные лимфоциты мыши. По средним данным титр регРФ в ответ на иммунизацию крыс мышинными лимфоцитами практически не изменялся, однако только на 7-й день отмечается значительное увеличение стандартного отклонения, что указывает на ярко выраженный индивидуальный характер реакции крыс на введение гетерологичных мышинных лимфоцитов. Иммунизация животных

Адрес для переписки:

Кряжевских Анастасия Вадимовна
ФГБОУ ВО «Удмуртский государственный университет»
426034, Россия, Удмуртская Республика,
г. Ижевск, ул. Университетская, 1.
Тел./факс: 8 (3412) 91-64-26.
E-mail: krav526@gmail.com

Address for correspondence:

Anastasia V. Kryazhevskikh
Udmurt State University
1 Universitetskaya St
Izhevsk, Udmurt Republic
426034 Russian Federation
Phone/fax: +7 (3412) 91-64-26.
E-mail: krav526@gmail.com

Образец цитирования:

А.В. Кряжевских, Н.Н. Абишева «Регуляторный ревматоидный фактор в крови крыс, иммунизированных аутологичными лимфоцитами, активированными *in vitro* гетерологичными лимфоцитами» // Российский иммунологический журнал, 2025. Т. 28, № 3. С. 449-454.
doi: 10.46235/1028-7221-17142-RRF

© Кряжевских А.В., Абишева Н.Н., 2025
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

A.V. Kryazhevskikh, N.N. Abisheva "Rheumatoid regulatory factor in the blood of rats immunized with autologous lymphocytes, activated *in vitro* by heterologous lymphocytes", Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2025, Vol. 28, no. 3, pp. 449-454.
doi: 10.46235/1028-7221-17142-RRF

© Kryazhevskikh A.V., Abisheva N.N., 2025
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.46235/1028-7221-17142-RRF

СКЛ вызвала двухфазный подъем регРФ в крови, на 5-й и 21-й дни. Повышение регРФ на 5-й день после иммунизации СКЛ свидетельствует о реакции на активированные гетерологичным антигеном аутологичные лимфоциты. Полученные результаты открывают перспективу для дальнейших исследований, направленных на разработку методов индукции приобретенной толерантности.

Ключевые слова: аутологичные лимфоциты, гетерологичные лимфоциты, смешанная культура лимфоцитов, регуляторный ревматоидный фактор, аутотрансплантация, ксенотрансплантация

RHEUMATOID REGULATORY FACTOR IN THE BLOOD OF RATS IMMUNIZED WITH AUTOLOGOUS LYMPHOCYTES, ACTIVATED *IN VITRO* BY HETEROLOGOUS LYMPHOCYTES

Kryazhevskikh A.V., Abisheva N.N.

Udmurt Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Izhevsk, Udmurt Republic, Russian Federation

Udmurt State University, Izhevsk, Udmurt Republic, Russian Federation

Abstract. The approaches to prevention of acute and chronic transplant rejection are among the important challenges in clinical transplantology and regenerative medicine. For more than a century, induction of tolerance to natural and artificial transplant antigens has been a desired goal. Recently, anti-lymphocytic antibodies to activated lymphocytes, called regulatory rheumatoid factor (regRF), are shown to be involved in control of autoreactive lymphocytes under normal conditions, thus maintaining natural immune tolerance. A relatively rapid increase in the level of regRF in the blood (3-5 days) after immunization is observed during autotransplantation. Its early rise is also associated with non-reactivity of animals to experimentally induced autoimmune disorders. The aim of our study was to search an opportunity of regRF production in rats by injecting autologous lymphocytes activated *in vitro* by a heterologous antigen (murine lymphocytes). To achieve this result, a group of rats was immunized intravenously with a mixed culture of autologous and heterologous (murine) lymphocytes (MLC), after 5 days of co-incubation. Another group was immunized with murine lymphocytes only. RegRF in the blood was determined by days 3, 5, 7, 14, 21, 28 and 35 after immunization. It was hypothesized that the intravenous injection of autologous MLC-activated rat lymphocytes and mouse lymphocytes to the rats would cause an early regRF response to autologous lymphocytes, and a later response to heterologous mouse lymphocytes. On average, the regRF titer in rats following immunization with murine lymphocytes did not show significant changes. However, a significant increase in the standard deviation was seen only on day 7, thus indicating to a pronounced individual response of rats to the injection of heterologous murine lymphocytes. Immunization of animals with MLC-activated cells caused a two-phase increase of regRF in blood observed on days 5 and 21. An increase in regRF on day 5 after MLC immunization suggests a response to autologous lymphocytes activated by a heterologous antigen. The obtained results open up a prospect for further research aimed at developing novel techniques for inducing acquired tolerance.

Keywords: autologous lymphocytes, heterologous lymphocytes, mixed lymphocyte culture, regulatory rheumatoid factor, autotransplantation, xenotransplantation

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (FEWS-2024-0002).

Введение

Отторжение трансплантата, вне зависимости от его природы, является одной из главных проблем, которая сдерживает развитие клинической

трансплантологии. Приоритетной задачей в области трансплантологии и иммунологии остается поиск способов индукции иммунологической толерантности у реципиентов к трансплантатам. Наряду с исследованиями в области иммуносупрессивной терапии, в настоящее время разрабатываются альтернативные подходы к индукции иммунологической толерантности на основе клеточных технологий [2, 8]. В некоторых экспе-

риментальных моделях на животных удалось достигнуть толерантность к аллотрансплантатам солидных органов, но последовательное формирование толерантности у пациентов все еще остается труднодостижимой целью. Установлено, что для обеспечения острого отторжения большинства аллотрансплантатов необходимы мощные адаптивные иммунные реакции, инициированные провоспалительными Т-клетками, активированными через прямые и не прямые пути во вторичных лимфоидных органах [5].

Изучение методов индукции приобретенной толерантности к естественным и искусственным антигенам невозможно без понимания механизмов формирования и поддержания в ходе онтогенеза естественной толерантности к собственным антигенам. В ряде экспериментов показано, что толерантность можно индуцировать длительным введением малых доз антигена или однократным введением большой дозы антигена [3, 6]. Также много работ посвящено роли Treg клеткам в индукции и поддержании толерантности [9, 11, 12]. Вместе с тем активно развиваются методы тканевого типирования [7] и выявления предсуществующих донор-специфических антител [10].

Недавно открытый новый фактор регуляции аутореактивности получил название регуляторный ревматоидный фактор (регРФ). РегРФ представляет собой популяцию антиидиотипических антител, несущих дополнительную общую специфичность к Fc-фрагментам IgG, которая ассоциирована с иммуносупрессивными свойствами данных антител по отношению к аутореактивным лимфоцитам. Будучи антиидиотипическими антителами, регРФ ограничивает экспансию CD4⁺T-лимфоцитов тем идиотипом, для которого он специфичен, в соответствии с принципом отрицательной обратной связи. Показано, что мишенью регРФ являются только активированные CD4⁺T-лимфоциты [4]. Ранняя продукция регРФ была ассоциирована с нечувствительностью животных к экспериментально вызванным аутоиммунным реакциям [13]. Поэтому регРФ может рассматриваться как перспективная мишень для индукции приобретенной толерантности к чужеродным антигенам.

Целью нашего исследования было выяснить, можно ли индуцировать продукцию регРФ у крыс введением аутологичных лимфоцитов, активированных *in vitro* гетерологичным антигеном (лимфоциты мыши).

Идея эксперимента заключалась в том, что, если крысам ввести аутологичные лимфоциты, активированные гетерологичными (мышинными) лимфоцитами *in vitro*, это вызовет относительно раннюю продукцию регРФ в ходе иммунного ответа, по продукции которого можно судить об

иммуносупрессии аутологичных лимфоцитов, активированных *in vitro* гетерологичными лимфоцитами. Тогда как введение гетерологичного антигена вызовет более поздний иммунный ответ.

Материалы и методы

Крысы популяции Wistar были доставлены из племенного комплекса «Рапполово» (НИЦ «Курчатовский институт» – ПИЯФ – ПЛЖ «Рапполово», Россия). Белые беспородные мыши приобретены из БУ УР «Удмуртский ветеринарно-диагностический центр» (БУ УР «УВДЦ», г. Ижевск, Россия). Эксперименты на животных проводились в соответствии с руководящими принципами ARAR, Законом Великобритании о животных (научные процедуры) 1986 года и Директивой ЕС 2010/63/ЕС об экспериментах на животных. Применяемые протокол и процедуры были этически проверены и одобрены Комитетом по биоэтике Удмуртского государственного университета (дата 18.01.2021/№ 2102).

Для проведения исследования крысы популяции Wistar были поделены на две группы. Первую группу (n = 6) иммунизировали внутривенно гетерологичными (мышинными) лимфоцитами. Кровь у мыши забирали в объеме 1-1,5 мл декапитацией с 3,8% цитратом натрия (НПП «ПанЭко», Россия), разводили до необходимого объема средой RPMI-1640 (НПП «ПанЭко», Россия), перемешали и нанесли на фиколл ($\rho = 1,077$) (НПП «ПанЭко», Россия) в соотношении 1:2. Центрифугировали в течение 30 мин при 1500 об/мин. Лимфоциты отобрали и отмыли в среде RPMI-1640 трижды (1 раз – при 1500 об/мин в течение 10 минут, 2 и 3 раз – при 1500 об/мин в течение 7 минут). Приготовили суспензию лимфоцитов – развели клетки от каждого образца в 1 мл среды RPMI-1640. Подсчитали количество выделенных клеток в камере Горяева, с помощью красителя трипановый синий (0,2%-ный раствор на 3ФР). Полученное количество клеток доводили до 100 мкл, иммунизировали крыс внутривенно. Проводили забор крови у крыс для получения сыворотки, в сыворотке определяли регРФ. Определение титра регРФ методом агглютинации танализованных, нагруженных гомологичным IgG эритроцитов проводили по методике [1].

Вторую группу (n = 6) иммунизировали аутологичными лимфоцитами, предварительно активированными *in vitro* гетерологичными (мышинными) лимфоцитами. Все этапы работы проводили в стерильных условиях под ламинаром. Кровь у мыши забрали в объеме 1-1,5 мл декапитацией, у крысы в объеме 3-5 мл методом кардиальной пункции с 3,8% цитратом натрия.

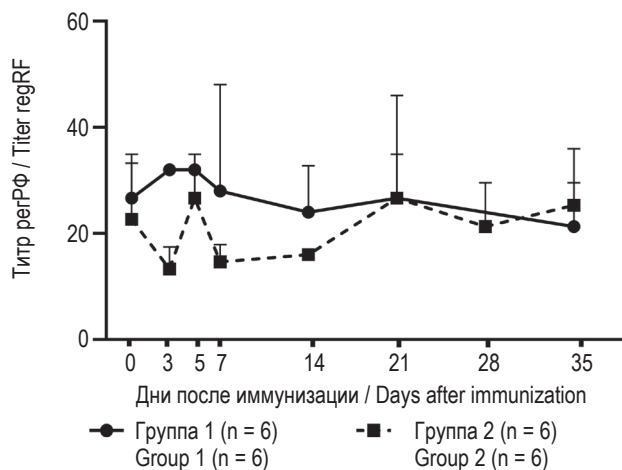


Рисунок 1. Уровень регРФ в крови крыс после введения гетерологических (мышинных) лимфоцитов (группа 1), после введения аутологичных лимфоцитов, активированных *in vitro* гетерологическими (мышинными) лимфоцитами (группа 2)

Примечание. На рисунке представлены средние значения $\pm$ SD. Оценивали регРФ методом агглютинации танализованных, нагруженных гомологичным IgG эритроцитов.

Figure 1. The level of regRF in the blood of rats after the introduction of heterologous (mouse) lymphocytes (group 1), after the introduction of autologous lymphocytes activated *in vitro* by heterologous (mouse) lymphocytes (group 2)

Note. The figure shows the average values $\pm$ SD. RegRF was assessed by the agglutination method of tanized erythrocytes loaded with homologous IgG.

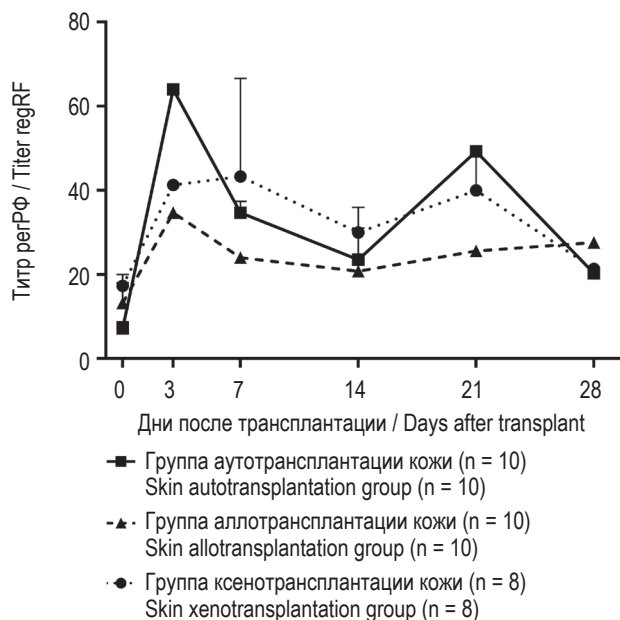


Рисунок 2. Уровень регРФ у крыс при ауто- (n = 10), алло- (n = 10) и ксено- (n = 8) трансплантации кожи в течение 28 дней эксперимента

Примечание. См. примечание к рисунку 1.

Figure 2. The level of regRF in rats with auto- (n = 10), allo- (n = 10), and xenotransplantation (n = 8) of skin during 28 days of the experiment

Note. As for Figure 1.

Выделение лимфоцитов и подсчет клеток производили аналогично первой экспериментальной группе. В 24-луночном культуральном планшете (Corning, США) ставили смешанную культуру лимфоцитов (СКЛ), в которой содержалось по 5×10^5 клеток от каждого образца лимфоцитов крысы и мыши. Так, конечная концентрация клеток в одной лунке 24-луночного культурального планшета составила 1×10^6 клеток. Суспензия лимфоцитов была разлита на 4 лунки, следовательно, общее количество клеток в смешанной культуре от одной пары «крыса-мышь» составило 4×10^6 . Инкубировали полученные культуры в CO2-инкубаторе (Eppendorf, Германия), а через 5 суток от начала культивирования вводили крысам внутривенно после доведения клеток до 100 мкл. Проводили забор крови у крыс для получения сыворотки, в сыворотке определяли регРФ. Оценку метаболической активности выполняли с помощью набора «Глюкоза ФКД» (ООО «Фармацевтика и Клиническая Диагностика», Россия). Определение титра регРФ проводили по методике [1].

Результаты и обсуждение

Измерение метаболической активности лимфоцитов по потреблению глюкозы в питательной среде после 5 дней инкубации показало, что концентрация глюкозы соответствует норме — наблюдается небольшое ее снижение в питательной среде, в среднем на 1,57 ммоль/л, что говорит об адекватной метаболической активности лимфоцитов и является позитивным фактором жизнедеятельности клеточной культуры.

При анализе жизнеспособности клеток после 5 дней инкубации было обнаружено, что процент живых клеток от общего количества клеток составляет 34-70%.

Для проверки гипотезы о том, что толерантность можно индуцировать введением животным активированных аутологичных лимфоцитов, что, в свою очередь, должно привести к повышению уровня регРФ, крысам внутривенно вводили СКЛ. Результаты измерения уровня регРФ представлены на рисунке 1.

В группе 1 можно наблюдать рост титра регРФ на 3-5-й день после начала иммунизации, далее его уровень постепенно снижается и уже не поднимается в течение всего эксперимента. График изменения уровня регРФ в группе животных, иммунизированных гетерологическими (мышинными) лимфоцитами (группа 1) (рис. 1) очень схож с графиком изменения уровня регРФ в группе животных, которым была проведена ксено-трансплантация кожи (рис. 2). В качестве ксено-трансплантата был использован лоскут кожи мыши.

В группе 2 повышение уровня регРФ наблюдается на 5-й день от начала иммунизации (рис. 1), второе повышение отмечается на 21-й день, и титр регРФ не падает до конца наблюдения (35-й день от начала иммунизации). Кинетика регРФ в группе животных, иммунизированных аутологичными лимфоцитами, активированными *in vitro* гетерологичными (мышинными) лимфоцитами (группа 2) (рис. 1), схожа с кинетикой регРФ у животных, которым была проведена аутотрансплантация кожи (рис. 2).

Согласно гипотезе исследования регРФ является фактором негативной регуляции CD4⁺T-лимфоцитов и, в первую очередь, аутореактивных лимфоцитов. Соответственно, реакция на аутоантигены происходит быстрее, по аналогии

со вторичным иммунным ответом, тогда как на ксенотрансплантат иммунный ответ развивается позднее, что мы и ожидали получить. Поэтому, как и при трансплантации кожи, наблюдаемая нами ранняя продукция регРФ при введении аутологичных лимфоцитов возможна по причине уже установленного иммунного контроля в отношении собственных антигенов.

Выводы

Таким образом, активированные *in vitro* гетерологичным антигеном аутологичные лимфоциты вызвали относительно ранний ответ регРФ, что может свидетельствовать об установлении негативного регуляторного контроля.

Список литературы / References

1. Бедулева Л.В., Сидоров А.Ю., Абишева Н.Н., Гильманова Л.У., Горбушина А.Н. Метод определения отдельной популяции ревматоидного фактора с иммунорегуляторными свойствами // Российский иммунологический журнал, 2020. Т. 23, № 2. С. 187-190. [Beduleva L.M., Sidorov A.Yu., Abisheva N.N., Gilmanova L.U., Gorbushina A.N. Detection of immunoregulatory rheumatoid factor. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2020, Vol. 23, no. 2, pp. 187-190. (In Russ.)] doi: 10.46235/1028-7221-267-DOI.
2. Скворцова Е.В., Синенко С.А., Зенин В.В., Томилин А.Н. Получение регуляторных дендритных клеток из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток мыши для их использования в моделях трансплантации тканей // Гены и клетки, 2019. Т. 14. С. 214-215. [Skvortsova E.V., Sinenko S.A., Zenin V.V., Tomilin A.N. Obtaining regulatory dendritic cells from induced pluripotent stem cells of mice for their use in tissue transplantation models. *Geny i kletki = Genes and Cells*, 2019, Vol. 14, pp. 214-215. (In Russ.)]
3. Andre C., Heremans J.F., Vaerman J.P., Cambiaso C.L. A mechanism for the induction of immunological tolerance by antigen feeding: antigen-antibody complexes. *J. Exp. Med.*, 1975, Vol. 142, no. 6, pp. 1509-1519.
4. Beduleva L., Menshikov I., Stolyarova E., Fomina K., Lobanova O., Ivanov P., Terentiev A. The rheumatoid factor in idiopathic regulation of autoimmunity. *Int. J. Rheum. Dis.*, 2015, Vol. 18, pp. 408-420.
5. Benichou G., Tonsho M., Tocco G., Nadazdin O., Madsen J.C. Innate immunity and resistance to tolerogenesis in allotransplantation. *Front. Immunol.*, 2021, Vol. 3, 73. doi: 10.3389/fimmu.2021.00073.
6. Bercovici N., Delon J., Cambouris C., Escriou N., Debre P., Liblau R.S. Chronic intravenous injections of antigen induce and maintain tolerance in T cell receptor-transgenic mice. *Eur. J. Immunol.*, 1999, Vol. 29, no. 1, pp. 345-354.
7. Heeger P.S., Dinavahi R. Transplant immunology for non-immunologist. *Mt. Sinai J. Med.*, 2012, Vol. 79, pp. 376-387.
8. Kholodenko I.V., Kholodenko R.V., Lupatov A.Yu., Yarygin K.N. Cell therapy as a tool for induction of immunological tolerance after liver transplantation. *Bull. Exp. Biol. Med.*, 2018, Vol. 165, no. 4, pp. 554-563.
9. Lu J., Li P., Du X., Liu Y., Zhang B., Qi F. Regulatory T cells induce transplant immune tolerance. *Transpl. Immunol.*, 2021, Vol. 67, 101411. doi: 10.1016/j.trim.2021.101411.
10. Martinez O.M., Rosen H. R. Basic Concepts in transplant immunology. *Liver Transpl.*, 2005, Vol. 11, no. 4, pp. 370-381.
11. Romano M., Fanelli G., Albany C.J., Giganti G., Lombardi G. Past, present, and future of regulatory T cell therapy in transplantation and autoimmunity. *Front. Immunol.*, 2019, Vol. 10, 43. doi: 10.3389/fimmu.2019.00043.
12. Romano M., Sim L.T., Lesley A.S., Giovanna L. Treg therapy in transplantation: a general overview. *Transpl. Int.*, 2017, Vol. 30, no. 8, pp. 745-753.

13. Sidorov A., Beduleva L., Menshikov I., Terentiev A., Stolyarova E., Abisheva N. Fc fragments of immunoglobulin G are an inductor of regulatory rheumatoid factor and a promising therapeutic agent for rheumatic diseases. *Int. J. Biol. Macromol.*, 2017, Vol. 95, pp. 938-945.

Авторы:

Кряжевских А.В. — инженер-исследователь лаборатории биосовместимых материалов ФГБУН «Удмуртский федеральный исследовательский центр» Уральского отделения Российской академии наук; аспирант кафедры иммунологии и клеточной биологии ФГБОУ ВО «Удмуртский государственный университет», г. Ижевск, Удмуртская Республика, Россия

Абишева Н.Н. — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории биосовместимых материалов ФГБУН «Удмуртский федеральный исследовательский центр» Уральского отделения Российской академии наук; старший научный сотрудник лаборатории молекулярной и клеточной иммунологии, доцент кафедры иммунологии и клеточной биологии ФГБОУ ВО «Удмуртский государственный университет», г. Ижевск, Удмуртская Республика, Россия

Authors:

Kryazhevskikh A.V., Research Engineer, Laboratory of Biocompatible Materials, Udmurt Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences; Postgraduate Student, Department of Immunology and Cell Biology, Udmurt State University, Izhevsk, Udmurt Republic, Russian Federation

Abisheva N.N., PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratory of Biocompatible Materials, Udmurt Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences; Senior Researcher, Laboratory of Molecular and Cellular Immunology, Associate Professor, Department of Immunology and Cell Biology, Udmurt State University, Izhevsk, Udmurt Republic, Russian Federation

Поступила 27.03.2025
Отправлена на доработку 01.04.2025
Принята к печати 25.05.2025

Received 27.03.2025
Revision received 01.04.2025
Accepted 25.05.2025

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ВЛИЯНИЯ АЛЬФА-ЛИПОЕВОЙ КИСЛОТЫ И АМИНОДИГИДРОФТАЛАЗИНДИОНА НАТРИЯ НА ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ СТАРЫХ КРЫС С ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫМ ДИАБЕТОМ

Среднева Л.А., Султанова Т.Р.

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

Резюме. Пожилые люди являются группой с высоким риском возникновения сахарного диабета (СД). Как старение, так и СД способны влиять на гематологические показатели, отражая основные физиологические и патологические процессы. Аддитивное влияние процесса старения и диабета может усугубить изменения в параметрах общей крови, приводя к более серьезным гематологическим изменениям и повышенному риску осложнений. Для коррекции патологических процессов, возникших на фоне развития СД, активно используют антиоксиданты и противовоспалительные препараты. Однако воздействие таких веществ, как альфа-липоевая кислота (ЛК) и препарата аминодигидрофталазиндиона натрия (АФГ) на параметры крови недостаточно исследовано. Цель работы — оценка и сравнение влияния ЛК и АФГ на биохимические и гематологические параметры старых крыс с аллоксановым СД. Исследование выполнено на 35 белых крысах самцах стока Wistar, которые были разделены на 5 групп: 1-я — молодые (5 месяцев) интактные, 2-я — старые (18 месяцев) интактные, 3-я — старые с СД, 4-я — старые с СД и введением ЛК, 5-я — старые с СД и введением АФГ. Диабет индуцировали путем внутрибрюшинного введения аллоксана. ЛК вводилась животным с СД внутримышечно с дозировкой 4 мг/100 г веса животного через день в течение 30 дней. АФГ вводился внутримышечно с дозировкой 2 мг/100 г веса животного по следующей схеме: 10 дней — ежедневно, 5 дней — через день, 15 дней — через 2 дня. Через 60 дней у животных была взята кровь для оценки уровня гликемии и гематологических показателей. Биохимическое исследование выявило, что введение крысам-диабетикам ЛК и АФГ одинаково корректировало метаболические нарушения, снижая уровень глюкозы. Оценка гематологических показателей крови крыс показала увеличение ширины распределения эритроцитов с возрастом. Введение ЛК способствовало увеличению среднего объема эритроцитов и содержание гемоглобина в эритроците, но снижала концентрацию гемоглобина. Препарат АФГ достоверно повышал количество эритроцитов, концентрацию гемоглобина и гематокрит. Оба препарата значимо снижали относительное содержание лимфоцитов и достоверно увеличивали

Адрес для переписки:

Среднева Любовь Александровна
ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии»
Уральского отделения Российской академии наук
620049, Россия, г. Екатеринбург,
ул. Первомайская, 106.
Тел.: 8 (982) 643-19-42.
E-mail: lyubabio44@gmail.com

Address for correspondence:

Lyubov A. Sredneva
Institute of Immunology and Physiology,
Ural Branch, Russian Academy of Sciences
106 Pervomayskaya St
Ekaterinburg
620049 Russian Federation
Phone: +7 (982) 643-19-42.
E-mail: lyubabio44@gmail.com

Образец цитирования:

Л.А. Среднева, Т.Р. Султанова «Сравнительная характеристика влияния альфа-липоевой кислоты и аминодигидрофталазиндиона натрия на гематологические показатели старых крыс с экспериментальным диабетом» // Российский иммунологический журнал, 2025. Т. 28, № 3. С. 455-460.
doi: 10.46235/1028-7221-17135-EOA
© Среднева Л.А., Султанова Т.Р., 2025
Эта статья распространяется по лицензии Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

L.A. Sredneva, T.R. Sultanova "Effect of α -lipoic acid and APG on blood parameters", Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2025, Vol. 28, no. 3, pp. 455-460.
doi: 10.46235/1028-7221-17135-EOA
© Sredneva L.A., Sultanova T.R., 2025
The article can be used under the Creative Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.46235/1028-7221-17135-EOA

относительное содержание гранулоцитов. Препараты АЛ и АФГ снижали общее число и объем тромбоцитов, а также показатель анизоцитоза тромбоцитов, при этом увеличивали тромбокрит. Введение как ЛК, так и АФГ воздействовало на состояние гипергликемии животных с аллоксан-индуцированным СД путем снижения уровня глюкозы. Оба препарата имели схожее влияние на показатели белой крови и тромбоцитарного звена крыс, но обладали разными корректирующими свойствами на показатели красной крови крыс с аллоксановым СД.

Ключевые слова: экспериментальный диабет, старение, общий анализ крови, антиоксиданты, противовоспалительные препараты, аллоксановый диабет

EFFECT OF α -LIPOIC ACID AND APG ON BLOOD PARAMETERS

Sredneva L.A., Sultanova T.R.

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

Abstract. The elderly persons are a high-risk group for the development of diabetes mellitus (DM). Both aging and DM can influence hematological parameters related to key physiological and pathological processes. The additive effect of aging and diabetes may exacerbate alterations in general blood counts, thus leading to more pronounced hematological changes and an increased risk of complications. To mitigate pathological processes associated with DM, antioxidants and anti-inflammatory drugs are widely utilized. However, the effects of certain compounds, such as alpha-lipoic acid (ALA) and sodium aminodihydrophthalazinedione (APG), on blood parameters remain scarcely investigated. The aim of this study was to evaluate and compare the effects of ALA and APG on biochemical and hematological parameters in aged rats with alloxan-induced DM. The study was conducted in 35 male Wistar rats, which were divided into five groups: 1 – young (5 mo) intact animals, 2 – aged (18 mo) intact animals, 3 – aged rats with DM, 4 – aged rats with DM treated with ALA, 5 – aged rats with DM treated with APG. Experimental diabetes was induced by intraperitoneal administration of alloxan. ALA was administered daily intramuscularly to diabetic animals at a dose of 4 mg/100 g of body weight for 30 days. APG was administered intramuscularly at a dose of 2 mg/100 g of body weight at the following regimen: daily for 10 days, daily for the next 5 days, and every 3rd day for the remaining 15 days. On day 60, blood samples were collected to assess glycemic levels and hematological parameters. Biochemical analysis revealed that both ALA and APG administration corrected metabolic disturbances in diabetic rats in similar manner, significantly reducing blood glucose levels. Hematological analysis showed an age-associated increase in size scatter of red blood cell (RBC). Administration of ALA led to an increase in mean corpuscular volume and mean corpuscular Hb, but a decrease in mean corpuscular Hb concentration. In contrast, APG significantly increased RBC counts, hemoglobin concentration, and hematocrit. Both agents significantly reduced the relative lymphocyte count and increased the relative granulocyte count. ALA and APG also reduced total platelet count, mean platelet volume, and size scatter of platelets, while increasing the 'plateletcrit'. Administration of both ALA and APG alleviated hyperglycemia in rats with alloxan-induced diabetes by lowering blood glucose levels. Both compounds exerted similar effects upon white blood cell and platelet parameters, however, they differed in their ability to correct RBC indices in diabetic rats.

Keywords: experimental diabetes mellitus, aging, blood cell count, antioxidants, anti-inflammatory agents, alloxan diabetes

Работа выполнена в рамках государственного задания ИИФ УрО РАН (регистрационный номер темы 122020900136-4) с использованием оборудования ЦКП ИИФ УрО РАН.

Введение

Пожилые люди являются группой с высоким риском возникновения сахарного диабета (СД) [8]. Как старение, так и диабет способны изменять гематологические параметры, влияя на общее состояние здоровья и риск возникновения различных заболеваний. Пожилые люди часто

демонстрируют сниженные уровни гемоглобина (Hb) и гематокрита (Ht), что коррелирует с такими патологическими состояниями, как сердечно-сосудистые заболевания и диабет [10]. У пациентов с СД гематологические изменения, как правило, связаны с выработкой активных форм кислорода в результате длительной гипергликемии [6]. Эти изменения выражаются в значительном снижении уровня Hb, Ht, среднего объема эритроцитов (MCV) и среднего содержания гемоглобина в эритроците (MCH) [7]. Кроме того, у диабетиков часто наблюдается повышенное общее количество лейкоцитов (TLC), что указыва-

ет на возникший воспалительный ответ на фоне развития СД [11].

В дополнение к вышесказанному важно отметить, что в процессе старения окислительный стресс и воспаление играют важную роль в патогенезе СД по причине того, что эти процессы взаимосвязаны и создают порочный круг, ухудшая состояние больных диабетом [9]. В связи с этим для коррекции патологических процессов, возникших на фоне развития СД, активно используют антиоксиданты и противовоспалительные препараты. На сегодняшний день показано, что альфа-липоевая кислота (ЛК) за счет своей антиоксидантной активности способна не только корригировать метаболические нарушения при СД, но и потенциально улучшать состояние анемии у пациентов с СД, проходящих гемодиализ [5]. В исследованиях на животных с экспериментальным СД были продемонстрированы иммуномодулирующие и противовоспалительные свойства препарата аминодигидрофалазиндиона натрия (АФГ) [1, 2]. Однако эффекты влияния АФГ на гематологические параметры крови напрямую не исследовались.

Таким образом, необходимы дополнительные исследования влияния антиоксидантов и противовоспалительных препаратов на гематологические параметры в контексте аддитивного влияния старения и диабета на модели старых животных с экспериментальным СД.

Цель — оценить и сравнить влияние ЛК и АФГ на биохимические и гематологические параметры старых крыс с аллоксан-индуцированным СД.

Материалы и методы

Исследование выполнено на 35 белых крысах самцах стока Wistar, которые содержались в стандартных условиях вивария ИИФ УрО РАН. Эксперимент на животных был одобрен локальным этическим комитетом ИИФ УрО РАН и выполнен в соответствии с принципами, сформулированными в Директиве 2010/63/ЕС Европейского парламента и Европейского совета от 22 сентября 2010 г. о защите животных, используемых в научных целях (Официальный журнал Европейского союза, 2010 г.).

Животные были разделены на 5 групп, по 7 животных в каждой: 1-я — молодые интактные животные возрастом 5 месяцев, 2-я — контрольная группа, старые интактные животные возрастом 18 месяцев, 3-я — старые животные возрастом 18 месяцев с экспериментальным СД, 4-я — старые животные возрастом 18 месяцев с экспериментальным СД и введением АЛК, 5-я — старые животные возрастом 18 месяцев с экспериментальным СД и введением АФГ. Сахарный диабет моделировали путем введения аллоксана по ав-

торской методике [3]. Альфа-липоевая кислота (препарат «Октолипен», Россия) вводилась животным с СД в виде готового раствора (30 мг/мл) один раз в два дня в течение 30 дней. Препарат ставился внутримышечно с дозировкой 4 мг/100 г веса животного. Аминодигидрофалазиндион натрия (препарат Тамерит®, Россия) вводился по следующей схеме: 10 дней — ежедневно, 5 дней — через день, 15 дней — через 2 дня, спустя 30 дней после первой инъекции аллоксана. Свежеприготовленный препарат ставился внутримышечно с дозировкой 2 мг/100 г веса животного. Через 60 дней все животные выводились из эксперимента посредством ингаляционной анестезии изофлураном с предварительным внутримышечным введением ксилазина (Alfasan, Woerden, Нидерланды) в дозе 0,1 мг/кг и золетила-100 в дозе 5 мг/кг (Virbac, Carros, Франция).

Перед выведением у животных натошак проводили забор периферической крови для проведения гематологического анализа, биохимического определения содержания глюкозы и гликированного гемоглобина (HbA1c). Гематологический анализ проводился с помощью автоматического гематологического анализатора Mindray BC-2800Vet (Mindray, Китай). Концентрацию глюкозы в плазме крови определяли унифицированным глюкозооксидазным колориметрическим методом набором «Глюкоза-Ново (500)» (АО «Вектор-Бест», г. Новосибирск, Россия), содержание гликированного гемоглобина в цельной крови — методом аффинной гель хроматографии с использованием набора реактивов «Диабет-тест» (ФОСФОСОРБ, Москва).

Статистическую обработку полученных данных выполняли с использованием программы GraphPad Prizm 8.0.2 (GraphPad Software Inc., США) и Microsoft Excel 2010. Данные представлены в виде средней арифметической и ее стандартной ошибки ($M \pm m$). Для оценки достоверности различий нескольких независимых выборок использовался однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA). Статистически значимыми считали различия при $p \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение

При оценке биохимических показателей у крыс с экспериментальным СД наблюдалась гипергликемия без значимого влияния на уровень гликированного гемоглобина вследствие недлительного повышения уровня глюкозы. Введение крысам-диабетикам препаратов ЛК и АФГ одинаково корригировало метаболические нарушения, что выражалось в достоверном снижении уровня глюкозы до показателей интактных животных (табл. 1).

ТАБЛИЦА 1. ИЗМЕНЕНИЯ БИОХИМИЧЕСКИХ И ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ КРОВИ КРЫС РАЗНЫХ ГРУПП, М±м
TABLE 1. CHANGES IN BIOCHEMICAL AND HEMATOLOGICAL BLOOD PARAMETERS OF RATS IN DIFFERENT GROUPS, M±m

Показатель Parameter	Интактные, 5 мес. Intact, 5 mo. n = 7	Интактные 18 мес. (контроль) Intact, 18 mo. (control) n = 7	СД17, 18 мес. DM17, 18 mo. n = 7	СД17 + ЛК, 18 мес. DM17 + LA, 18 mo. n = 7	СД17 + АФГ, 18 мес. DM17 + APG, 18 mo. n = 7
Биохимические показатели крови крыс / Biochemical parameters of rat blood					
Глюкоза, ммоль/л Glucose, mmol/L	7,70±0,30	9,80±0,04	14,60±2,93*	6,40±0,32 ***	6,56±0,68 ***
НбА1с, % HbA1c, %	5,00±0,13	5,08±0,30	6,10±0,71	4,65±0,30	4,64±0,21
Показатели красной крови крыс / Red blood cell counts in rats					
Эритроциты, млн/мкл Red blood cells, 10 ⁶ /μL	9,76±0,19	8,96±0,16	9,81±0,15	8,57±0,37	11,49±0,55 *, **, ***, ****
Гемоглобин, г/л Hemoglobin, g/L	176,43±4,54	158,33±3,89	153,30±0,29*	149,50±4,84*	175,20±8,25 ****
Гематокрит, % Hematocrit, %	49,89±1,20	43,10±1,98	46,00±0,91	46,50±1,52	56,38±2,66 **, ***, ****
Средний объем эритроцитов, фл Mean corpuscular volume, fL	51,16±0,58	48,10±2,37	46,92±0,30*	54,38±0,90 **, ***	49,10±1,09 ****
Среднее содержание гемоглобина в эритроците, пг Mean concentration hemoglobin, pg	18,01±0,27	17,70±0,62	15,65±0,16 *, **	17,53±0,49 ***	15,30±0,56 *, **, ****
Средняя концентрация гемоглобина в эритроците, г/л Mean corpuscular hemoglobin concentration, g/L	353,00±2,75	368,00±8,69	333,00±0,21 *, **	321,50±3,57 *, **	311,40±5,11 *, **, ***
Ширина распределения эритроцитов по объему, % Red cell distribution, %	12,59±0,31	16,67±0,32*	17,52±0,31*	16,18±0,40*	18,14±0,42 *, ****
Показатели белой крови крыс / White blood cell counts in rats					
Лейкоциты, тыс/мкл White blood cells, 10 ³ /μL	12,61±1,37	12,73±2,09	12,83±1,69	9,63±3,82	22,12±14,94
Лимфоциты, тыс/мкл Lymphocytes, 10 ³ /μL	8,80±1,01	5,27±0,60	7,02±1,19	3,43±0,72	10,74±8,81
Лимфоциты, % Lymphocytes, %	69,47±1,36	38,67±1,78*	53,33±1,49*	41,00±7,24*	36,80±5,72 *, ***
Моноциты, тыс/мкл Monocytes, 10 ³ /μL	0,37±0,06	1,23±0,32	1,42±0,22	0,55±0,20	2,52±2,26
Моноциты, % Monocytes, %	2,94±0,15	10,00±3,08	10,83±0,70*	8,25±2,88	7,00±2,18
Гранулоциты, тыс/мкл Granulocytes, 10 ³ /μL	3,44±0,34	6,23±1,64	4,40±0,37	5,65±3,33	8,86±3,90
Гранулоциты, % Granulocytes, %	27,59±1,29	48,00±3,08	35,83±1,71	50,75±10,02*	56,20±7,77*
Показатели тромбоцитарного звена крови / Blood platelet indices					
Тромбоциты, тыс/мкл Platelets, 10 ³ /μL	1094,71±68,44	885,00±131,87	947,67±38,46	721,00±49,72*	703,00±62,59*
Тромбокрит, % Thrombocrit, %	0,68±0,04	0,59±0,09*	0,63±0,02**	11,10±0,12 *, ***	11,02±0,08 *, ***

Таблица 1 (окончание)
Table 1 (continued)

Показатель Parameter	Интakтные, 5 мес. Intact, 5 mo. n = 7	Интakтные 18 мес. (контроль) Intact, 18 mo. (control) n = 7	СД17, 18 мес. DM17, 18 mo. n = 7	СД17 + ЛК, 18 мес. DM17 + LA, 18 mo. n = 7	СД17 + АФГ, 18 мес. DM17 + APG, 18 mo. n = 7
Средний объем тромбоцитов, фл Mean platelets volume, fL	6,21±0,05	6,63±0,16*	6,63±0,08 *, **	0,46±0,04 *, ***	0,46±0,04 *, ***
Показатель гетерогенности тромбоцитов, % Platelet distribution width, %	15,64±0,07	10,80±0,07*	11,23±0,10 *, **	6,38±0,13 *, ***	6,58±0,07 *, ***

Примечание. * – статистические различия с группой инт. 5 мес.; ** – статистические различия с группой инт. 18 мес.; *** – статистические различия с группой СД17 18 мес.; **** – статистические различия с группой СД17 + ЛК 18 мес. (ANNOVA, $p \leq 0,05$).

Note. *, statistical differences with the group int. 5 mo.; **, statistical differences with the group int. 18 mo.; ***, statistical differences with the group DM17 18 mo.; ****, statistical differences with the group DM17 + LA, 18 mo. (ANNOVA, $p \leq 0.05$).

При сравнении гематологических показателей красной крови интактных крыс двух возрастов было отмечено различие лишь в показателе ширины распределения эритроцитов. Видимо, с возрастом происходит увеличение аномальных форм эритроцитов, что характерно для анизоцитоза. У старых животных с экспериментальным диабетом сохраняется тенденция к анизоцитозу, что подтверждается исследованиями [4]. В сравнении с молодыми животными у крыс с аллоксановым диабетом отмечено снижение среднего объема эритроцитов, хотя значимых отличий в показателях содержания эритроцитов в периферической крови и гематокрите выявлено не было. В этой группе также было отмечено снижение концентрации гемоглобина, что отразилось на показателях среднего содержания и концентрации гемоглобина в эритроците. По сравнению с контрольной группой у крыс-диабетиков два последних показателя были достоверно ниже. Исследованные препараты влияли на показатели красной крови неодинаково. При введении ЛК отмечался рост показателей анизоцитоза, среднего объема эритроцитов и среднего содержания гемоглобина в эритроците, хотя концентрация самого гемоглобина и его средняя концентрация в эритроците, напротив, снизились. Это может свидетельствовать о тенденции к гиперхромии и неоднородности популяции красных клеток крови. В отличие от ЛК введение АФГ достоверно увеличивало абсолютное содержание эритроцитов, концентрацию гемоглобина и показатель гематокрита, а также увеличивало показатель ширины распределения эритроцитов по объему. При этом средний объем эритроцитов, среднее содержание и концентрация гемоглобина в эритроците были снижены. Это может свидетельствовать об изменениях в эритроцитарном росте и активации эритропоэза.

По результатам анализа показателей белой крови интактных крыс разных возрастов было зарегистрировано снижение относительного содержания лейкоцитов в группе старых животных. В сравнении с молодыми животными моделирование аллоксанового диабета отразилось на достоверном снижении относительного содержания лимфоцитов и увеличении относительного содержания моноцитов. Введение препаратов ЛК и АФГ имело схожее корректирующее влияние на показатели белой крови крыс с СД. Оба препарата значимо снижали относительное содержание лимфоцитов и достоверно увеличивали относительное содержание гранулоцитов.

Со стороны тромбоцитарного звена по сравнению с молодыми крысами в контрольной группе наблюдалось снижение показателей тромбоцита и гетерогенности тромбоцитов, а средний объем тромбоцитов, наоборот, увеличился. Аллоксан-индуцированный СД способствовал достоверному увеличению этих трех показателей у крыс-диабетиков. Препараты ЛК и АФГ имели схожее влияние на показатели тромбоцитарного звена крыс с СД. В обеих группах наблюдалось снижение общего числа тромбоцитов, их среднего объема и показателя анизоцитоза тромбоцитов. Введение ЛК и АФГ одинаково достоверно увеличивало показатель тромбоцита крыс.

Выводы

1. Введение как ЛК, так и АФГ воздействовало на состояние гипергликемии животных с аллоксан-индуцированным СД путем снижения уровня глюкозы. Исследованные ЛК и АФГ имели схожее влияние на показатели белой крови и тромбоцитарного звена крыс, но обладали разными корректирующими свойствами на показатели красной крови крыс с аллоксановым СД.

2. Введение ЛК, как и АФГ, животным с экспериментальным СД способствовало перераспределению типов лейкоцитов за счет снижения относительного числа лимфоцитов и увеличения относительного числа гранулоцитов. Препарат ЛК в большей мере способствовал анизоцитозу и гетерохромии эритроцитов, а также тромбо-

цитопении и снижению показателя анизоцитоза тромбоцитов.

3. Введение АФГ животным с аллоксан-индуцированным СД, напротив, оказывало влияние преимущественно на показатели красной крови за счет возможной стимуляции эритропоэза.

Список литературы / References

1. Абидов М.Т. Иммунотропная активность тамерита // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, 2000. Прил. 3. С. 11-19. [Abidov M.T. Immunotropic activity of tamarind. *Byulleten eksperimentalnoy biologii i meditsiny* = *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2000, Suppl. 3, pp. 11-19. (In Russ.)]
2. Булавинцева Т.С., Юшков Б.Г., Данилова И.Г., Абидов М.Т. Влияние макрофагов на инсулинсинтезирующую систему в норме и при аллоксановом диабете // Медицинская иммунология, 2023. Т. 25, № 2. С. 287-300. [Bulavintseva T.S., Yushkov B.G., Danilova I.G., Abidov M.T. Influence of macrophages on the insulin-synthesizing system under normal conditions and in alloxan diabetes. *Meditinskaya Immunologiya* = *Medical Immunology (Russia)*, 2023, Vol. 25, no. 2, pp. 287-300. (In Russ.)] doi: 10.15789/10.15789/1563-0625-IOM-2534.
3. Данилова И.Г., Гетте И.Ф., Булавинцева Т.С. Способ моделирования аллоксанового диабета. Патент RU 2534411 C1, 27.11.2014. [Danilova I.G., Gette I.F., Bulavintseva T.S. Method for simulating alloxan diabetes. Patent RU 2534411 C1, November 27, 2014].
4. Емельянов В.В., Леонтьев Д.В., Ищенко А.В., Булавинцева Т.С., Саватеева Е.А., Данилова И.Г. Атомно-силовая микроскопия эритроцитов и метаболические нарушения при экспериментальном сахарном диабете и его коррекции липоевой кислотой // Биофизика, 2016. Т. 61, № 6. С. 922-926. [Emelyanov V.V., Leontiev D.V., Ishchenko A.V., Bulavintseva T.S., Savateeva E.A., Danilova I.G. Atomic force microscopy of erythrocytes and metabolic disorders in experimental diabetes mellitus and its correction with lipoic acid. *Biofizika* = *Biophysics*, 2016, Vol. 61, no. 6, pp. 922-926. (In Russ.)]
5. Abdel Hamid D.Z., Nienaa Y.A., Mostafa T.M. Alpha-lipoic acid improved anemia, erythropoietin resistance, maintained glycemic control, and reduced cardiovascular risk in diabetic patients on hemodialysis: a multi-center prospective randomized controlled study. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.*, 2022, Vol. 26, no. 7, pp. 2313-2329.
6. Bambo G.M., Asmelash D., Alemayehu E., Gedefie A., Duguma T., Kebede S.S. Changes in selected hematological parameters in patients with type 1 and type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Front. Med.*, 2024, Vol. 11, 1294290. doi: 10.3389/fmed.2024.1294290.
7. Farooqui R., Afsar N., Afroze, I.A. Role and significance of hematological parameters in diabetes mellitus. *APALM*, 2019, Vol. 6, no. 3, pp. A-158-A-162.
8. GBD 2021 Diabetes Collaborators. Global, regional, and national burden of diabetes from 1990 to 2021, with projections of prevalence to 2050: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2021. *Lancet*, 2023, Vol. 402, no. 10397, pp. 203-234.
9. Halim M., Halim A. The effects of inflammation, aging and oxidative stress on the pathogenesis of diabetes mellitus (type 2 diabetes). *Diabetes Metab. Syndr.*, 2019, Vol. 13, no. 2, pp. 1165-1172.
10. Pathak B., Maimoon S. A cross-sectional study of hematological parameters in the geriatric population using peripheral smear examination and a five-part cell counter. *Cureus*, 2024, Vol. 16, no. 4, e57910. doi: 10.7759/cureus.57910.
11. Singh P., Vijay P., Chandra S., Singh S.K., Singh D., Devi P. Demographics and haematological parameters in patients with type II diabetes mellitus in uttar pradesh – a comparative study. *IJDR*, 2024, Vol. 35, no. 3, pp. 304-308.

Авторы:

Среднева Л.А. — младший научный сотрудник лаборатории морфологии и биохимии ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук, г. Екатеринбург, Россия

Султанова Т.Р. — младший научный сотрудник лаборатории морфологии и биохимии ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук, г. Екатеринбург, Россия

Authors:

Sredneva L.A., Junior Researcher, Laboratory of Morphology and Biochemistry, Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, Russian Federation

Sultanova T.R., Junior Researcher, Laboratory of Morphology and Biochemistry, Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, Russian Federation

Поступила 23.03.2025

Отправлена на доработку 09.05.2025

Принята к печати 31.05.2025

Received 23.03.2025

Revision received 09.05.2025

Accepted 31.05.2025

ИЗОФЛАВОНЫ КРАСНОГО КЛЕВЕРА (*TRIFOLIUM PRATENSE*) СНИЖАЮТ ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС В СЕЛЕЗЕНКЕ И ПЕЧЕНИ КРЫС С ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫМ ДИАБЕТОМ 2-ГО ТИПА

Соколова К.В., Туканов Д.А.

ФГАОУ ВО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина»,
г. Екатеринбург, Россия

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

Резюме. Сахарный диабет 2-го типа является хроническим заболеванием с множеством тяжелых осложнений. Число больных диабетом 2-го типа велико и продолжает нарастать по всему миру, что делает разработку новых средств лечения и профилактики данного заболевания крайне актуальной. Окислительный стресс, вызванный гипергликемией, является одним из основных факторов поражения и дисфункции органов при сахарном диабете 2-го типа. Учитывая тесную вовлеченность иммунной системы в патогенез диабета и его осложнений, представляет интерес возможность влияния на активность системы антиоксидантной защиты в органах иммуноопоза, в частности в селезенке. Печень, интегрирующая все виды обмена веществ, наравне с органами иммунной системы как вносит вклад в патогенез диабета 2-го типа, так и является его мишенью. Красный клевер (*Trifolium pratense*) представляет интерес как дешевый и доступный источник антиоксидантов. Целью работы была оценка действия перорального введения водных экстрактов изофлавонов цветков красного клевера (*Trifolium pratense*) на состояние антиоксидантной системы защиты в крови, селезенке и печени крыс с экспериментальным диабетом. В течение месяца трижды в неделю половозрелым самцам крыс со стрептозотоцин-никотинамидной моделью сахарного диабета 2-го типа перорально вводили водные экстракты изофлавонов цветков красного клевера (*Trifolium pratense*), полученные методами «зеленых технологий» с использованием глубоких природных эвтектических растворителей, в дозах 300 мг/кг и 600 мг/кг. В крови было определено содержание глюкозы, относительное содержание гликированного гемоглобина, количество лейкоцитов разных фракций. Биохимически была определена активность ферментов системы антиоксидантной защиты каталазы и супероксиддисмутазы, содержание

Адрес для переписки:

Соколова Ксения Викторовна
ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии»
Уральского отделения Российской академии наук
620078, Россия, г. Екатеринбург,
ул. Первомайская, 106.
Тел.: 8 (906) 800-72-58.
E-mail: xenia.sokolova@gmail.com

Address for correspondence:

Ksenia V. Sokolova
Institute of Immunology and Physiology,
Ural Branch, Russian Academy of Sciences
106 Pervomayskaya St
Ekaterinburg
620078 Russian Federation
Phone: +7 (906) 800-72-58.
E-mail: xenia.sokolova@gmail.com

Образец цитирования:

К.В. Соколова, Д.А. Туканов «Изофлавоны красного клевера (*Trifolium pratense*) снижают окислительный стресс в селезенке и печени крыс с экспериментальным диабетом 2-го типа» // Российский иммунологический журнал, 2025. Т. 28, № 3. С. 461–468.
doi: 10.46235/1028-7221-17188-RCT

© Соколова К.В., Туканов Д.А., 2025
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

K.V. Sokolova, D.A. Tukanov “Red clover (*Trifolium pratense*) isoflavones reduce oxidative stress in the spleen and liver of rats with type 2 diabetes”, *Russian Journal of Immunology / Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal*, 2025, Vol. 28, no. 3, pp. 461–468.
doi: 10.46235/1028-7221-17188-RCT

© Sokolova K.V., Tukanov D.A., 2025
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.46235/1028-7221-17188-RCT

продукта перекисного окисления липидов малонового диальдегида и эндогенного антиоксиданта восстановленного глутатиона в крови и тканях селезенки и печени. Введение экстрактов изофлавонов цветков красного клевера (*Trifolium pratense*) снижало гипергликемию и восстанавливало количество моноцитов и гранулоцитов в крови, сниженное у крыс с диабетом; нормализовало активность каталазы в печени и активность супероксиддисмутазы в селезенке, уровень малонового диальдегида в селезенке и печени и содержание восстановленного глутатиона в селезенке, измененные у крыс с диабетом, до показателей здорового контроля, вне зависимости от дозы. Экстракты изофлавонов цветков красного клевера (*Trifolium pratense*) ослабляют гипергликемию и снижают окислительный стресс в органах крыс с экспериментальным СД2. Экстракты изофлавонов обладают иммунофармакологическим действием, проявляющемся в воздействии на показатели системы перекисного окисления липидов-антиоксидантной защиты в селезенке.

Ключевые слова: окислительный стресс, селезенка, печень, сахарный диабет 2-го типа, изофлавоны, *Trifolium pratense*

RED CLOVER (*TRIFOLIUM PRATENSE*) ISOFLAVONES REDUCE OXIDATIVE STRESS IN THE SPLEEN AND LIVER OF RATS WITH TYPE 2 DIABETES

Sokolova K.V., Tukanov D.A.

B Yeltsin Ural Federal University, Ekaterinburg, Russian Federation

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

Abstract. Type 2 diabetes (T2D) is a chronic disease with a large number of severe complications. The number of T2D patients continues to grow worldwide. Hence, development of new prevention and treatment tools are extremely relevant. Oxidative stress caused by hyperglycemia is one of the main factors of organ damage and dysfunction in T2D. Due to close involvement of the immune system in pathogenesis of diabetes and its complications, the opportunity of influencing antioxidant defense system in immunopoietic system, especially, spleen, presents sufficient interest. The liver, which integrates all types of metabolism, along with immune organs, contributes to the T2D pathogenesis, being among its target organs. Red clover (*Trifolium pratense*) is of interest as an economic and accessible source of antioxidants. The aim of our work was to evaluate the effect of red clover isoflavones on the antioxidant defense system in blood, spleen and liver of rats with experimental diabetes. Sexually mature male rats with a streptozotocin-nicotinamide model of T2D were orally administered aqueous extracts of isoflavones, obtained by “green technology” methods using deep natural eutectic solvents, at the doses of 300 and 600 mg/kg. The animals were treated over one month, three times a week. Glucose levels, relative content of glycated hemoglobin, leukocyte numbers and differential blood counts were measured in blood. The activity of antioxidant enzymes (catalase and superoxide dismutase), malondialdehyde production (a lipid peroxidation product), and contents of reduced glutathione, an endogenous antioxidant, were determined in blood, liver and spleen by biochemical techniques. Administration of red clover isoflavone extracts (*Trifolium pratense*) caused reduction of hyperglycemia and restored the reduced number of monocytes and granulocytes in blood in diabetic rats. It also caused normalization of catalase activity in liver and superoxide dismutase activity in spleen, the malondialdehyde levels in spleen and liver, and reduced glutathione contents in spleen, which was changed in diabetic rats, to healthy control values, regardless of the dose. Isoflavone extracts from red clover flower (*Trifolium pratense*) attenuate hyperglycemia and reduce oxidative stress in the organs of rats with experimental T2D. Isoflavone extracts have an immunopharmacological effect, by influencing the parameters of lipid peroxidation-antioxidant defense system in the spleen.

Keywords: oxidative stress, spleen, liver, type 2 diabetes, isoflavones, *Trifolium pratense*

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 24-25-20147 (<https://rscf.ru/project/24-25-20147>) и Правительства Свердловской области.

Введение

Сахарный диабет 2-го типа (СД2) — хроническое заболевание, характеризующееся гипергликемией и резистентностью к инсулину, которым в настоящее время страдает почти полмиллиона человек по всему миру. СД2 и его осложнения ощутимо снижают качество жизни и накладывают бремя на здравоохранение и социальную сферу [10], что обуславливает необходимость дальнейшего поиска веществ, способных облегчить гликемическую нагрузку и снизить скорость прогрессирования СД2. Согласно современным представлениям, окислительный стресс (ОС), т.е. дисбаланс между продукцией активных форм кислорода и неспособностью эндогенной антиоксидантной системы нейтрализовать их пагубное действие на клетки и ткани, вызванный гипергликемией, является одним из основных факторов патогенеза СД2, развития его сосудистых осложнений [6], повреждения и дисфункции органов [7]. Таким образом, смягчение ОС в органах является желанным следствием профилактики и терапии СД2.

Развитие представлений о роли иммунной системы в патогенезе СД2 закономерно обращает внимание исследователей на органы иммунитета, в частности, на селезенку. Исследователи отмечают, что, с одной стороны, гипергликемия оказывает значительное воздействие на селезенку [12], что может выражаться в формировании иммунологической недостаточности, а с другой стороны, отмечают важную роль этого органа в развитии эндокринных заболеваний [8, 9]. Ранее нами было показано, что селезенка подвержена воздействию ОС при экспериментальном СД2 в большей степени, чем печень [3]. Между тем ОС в печени также влияет на развитие осложнений СД2 [1]. Не смотря на важность изучения возможностей ослабления оксидативного стресса в селезенке и печени при СД2, экспериментальных работ, раскрывающих данный вопрос, крайне мало.

Красный клевер (*Trifolium pratense*) широко используется в качестве источника изофлавонов (ИФ), обладающих антиоксидантными свойствами [5]. Однако особенности его действия на систему ПОЛ-АОЗ в разных органах не изучены.

Целью работы было оценить действие ИФ цветков красного клевера (*Trifolium pratense*) на состояние антиоксидантной системы защиты в

крови, селезенке и печени крыс с экспериментальным СД2.

Материалы и методы

Исследование проведено на 43 белых крысах-самцах Wistar массой $353,7 \pm 5,77$ грамма возрастом 12-13 недель, содержащихся в виварии на стандартном рационе для лабораторных животных DeltaFeeds (АО «БиоПро», Россия) с неограниченным доступом к чистой питьевой воде. На проведение эксперимента на животных было получено разрешение этического комитета ИИФ УрО РАН № 10/23 от 09.10.2023, все манипуляции с ними проводились в соответствии с рекомендациями международных этических комитетов и Директивой Совета ЕС 2010/63/EU.

Были сформированы следующие группы животных: 1) крысы с экспериментальным СД2; 2) крысы с экспериментальным СД2, получавшие экстракт ИФ в дозе 300 мг/кг массы тела (СД2 + ИФ 300); 3) крысы с экспериментальным СД2, получавшие экстракт ИФ в дозе 600 мг/кг массы тела (СД2 + ИФ 600); 4) здоровые крысы, получавшие экстракт ИФ в дозе 300 мг/кг (ИФ300); 5) здоровые крысы, получавшие экстракт ИФ в дозе 600 мг/кг (ИФ600); 6) здоровый контроль.

ИФ цветков красного клевера (*Trifolium pratense*) животные получали в виде водной суспензии перорально через зонд в дозах 300 и 600 мг/кг соответственно. Введение ИФ проводилось 3 раза в неделю на протяжении месяца (всего 12 доз). Экстракты ИФ были получены на базе Химико-технологического института Уральского федерального университета [4]. Контрольным животным из групп 1 и 6 вместо ИФ аналогичным образом вводили воду.

Для моделирования СД2 крысам производили в/б инъекции никотинамида (MilliporeSigma, США), растворенного в воде для инъекций, в дозе 110 мг/кг массы тела, а через 15 минут — стрептозотоцина (MilliporeSigma, США), растворенного в цитратном буфере (pH 4,5), в дозе 65 мг/кг (авторская модификация модели [11]). Крыс выводили из эксперимента декапитацией под изофлурановым (Laboratories Karizoo, S.A., Испания) наркозом, предварительно взяв кровь из хвостовой вены, извлекали селезенку и печень.

Показатели ОС определяли в тканях селезенки и печени (методика описана в [3], а также в крови (активность САТ (КФ 1.11.1.6) и СОД (КФ 1.15.1.1) — в эритроцитах, уровень МДА и содержание GSH — в цельной крови) (методика описана в [2]. Количество лейкоцитов в крови определяли при помощи гематологического анализатора Mindray BC-2800 Vet (Mindray, Китай). Концентрацию глюкозы в крови определя-

ли натощак (fasting blood glucose, FBG) в плазме глюкозооксидазным методом с использованием набора реагентов «Глюкоза-Ново» (АО «Вектор-Бест», г. Новосибирск)). Относительное содержание гликированного гемоглобина (HbA1c) в цельной крови определяли методом аффинной гель-хроматографии с использованием набора реактивов ГЛИКОТЕСТ (ЭЛТА, Москва, Россия). Измерение оптической плотности в ходе проведения биохимических исследований проводилось на спектрофотометре DU-800 (Beckman Coulter, США). При проведении работ было использовано оборудование Центра коллективного пользования ИИФ УрО РАН (ЦКП ИИФ УрО РАН).

Статистический анализ данных проводили с помощью программы OriginPro 9.0 (OriginLab Corporation, США). Значимость различий между группами оценивали с помощью непараметрического U-критерия Манна–Уитни, критический уровень значимости при проверке статистических гипотез принимали $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Введение ИФ приводило к снижению уровня FBG независимо от дозы, достоверное снижение HbA1c наблюдалось после курса ИФ в дозе 600 мг/кг (рис. 1А, Б).

У крыс с экспериментальным СД2 наблюдалась тенденция к снижению количества лейко-

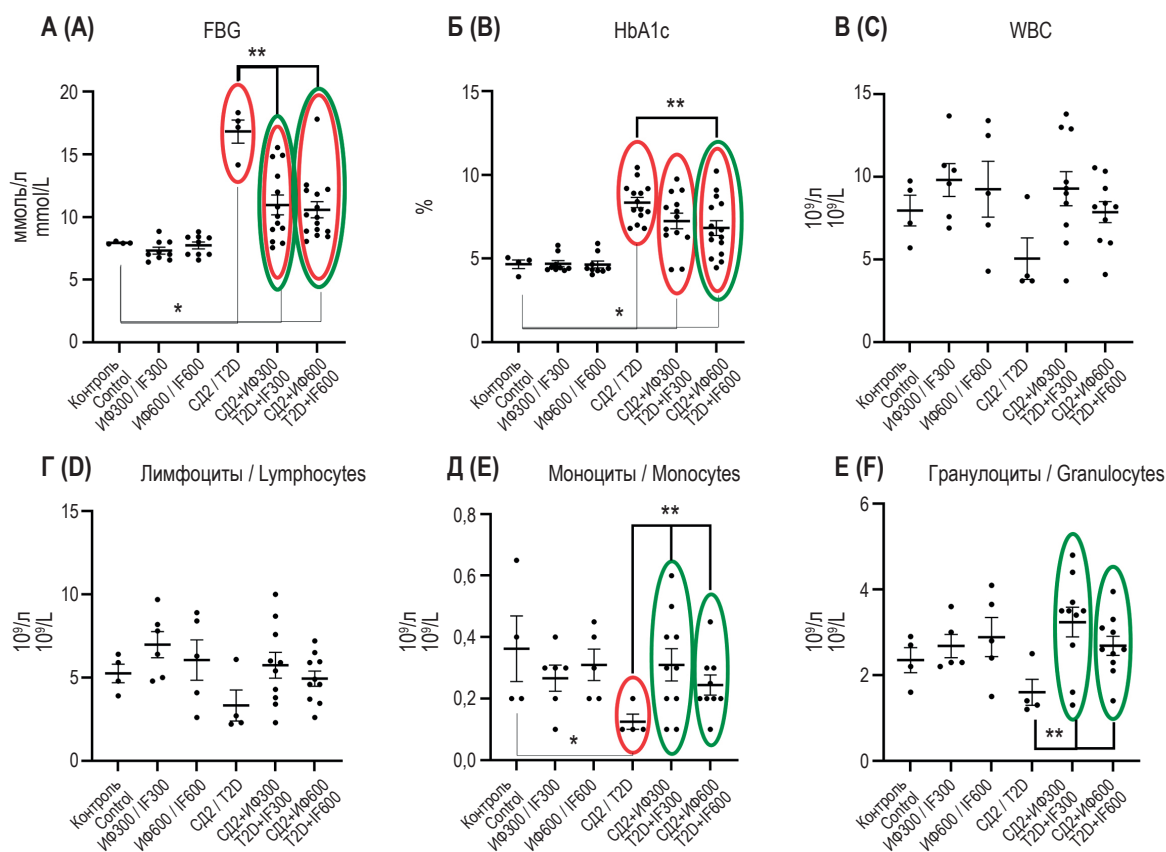


Рисунок 1. Влияние изофлавонов красного клевера (*Trifolium pratense*) на показатели крови у крыс с экспериментальным СД2, $M \pm m$, значение каждого животного показано отдельной точкой

Примечание. СД2 – экспериментальный сахарный диабет 2-го типа; ИФ – изофлавоны; ИФ300 и ИФ600 – дозы ИФ 300 и 600 мг/кг соответственно; FBG (fasting blood glucose) – концентрация глюкозы в крови натощак; WBC (white blood cell) – лейкоциты. * – $p < 0,05$ в сравнении с контрольной группой здоровых животных; ** – $p < 0,05$ в сравнении с контрольной группой животных с СД2. Красным овалом отмечено отличие показателя от здорового контроля, зеленым – отличие от СД2 при приеме ИФ.

Figure 1. Effect of red clover (*Trifolium pratense*) isoflavones on the blood parameters in rats with experimental T2D, $M \pm m$, the value of each animal is shown as a separate point

Note. T2D, experimental diabetes type 2; IF, isoflavones; IF300 and IF600, doses of IF of 300 and 600 mg/kg, respectively; FBG (fasting blood glucose), fasting blood glucose concentration; WBC (white blood cell), leukocytes. *, $p < 0.05$ in comparison with the control group of healthy animals; **, $p < 0.05$ in comparison with the control group of animals with T2D. The red oval marks the difference from the healthy control, the green one shows the difference between T2D and T2D + IF.

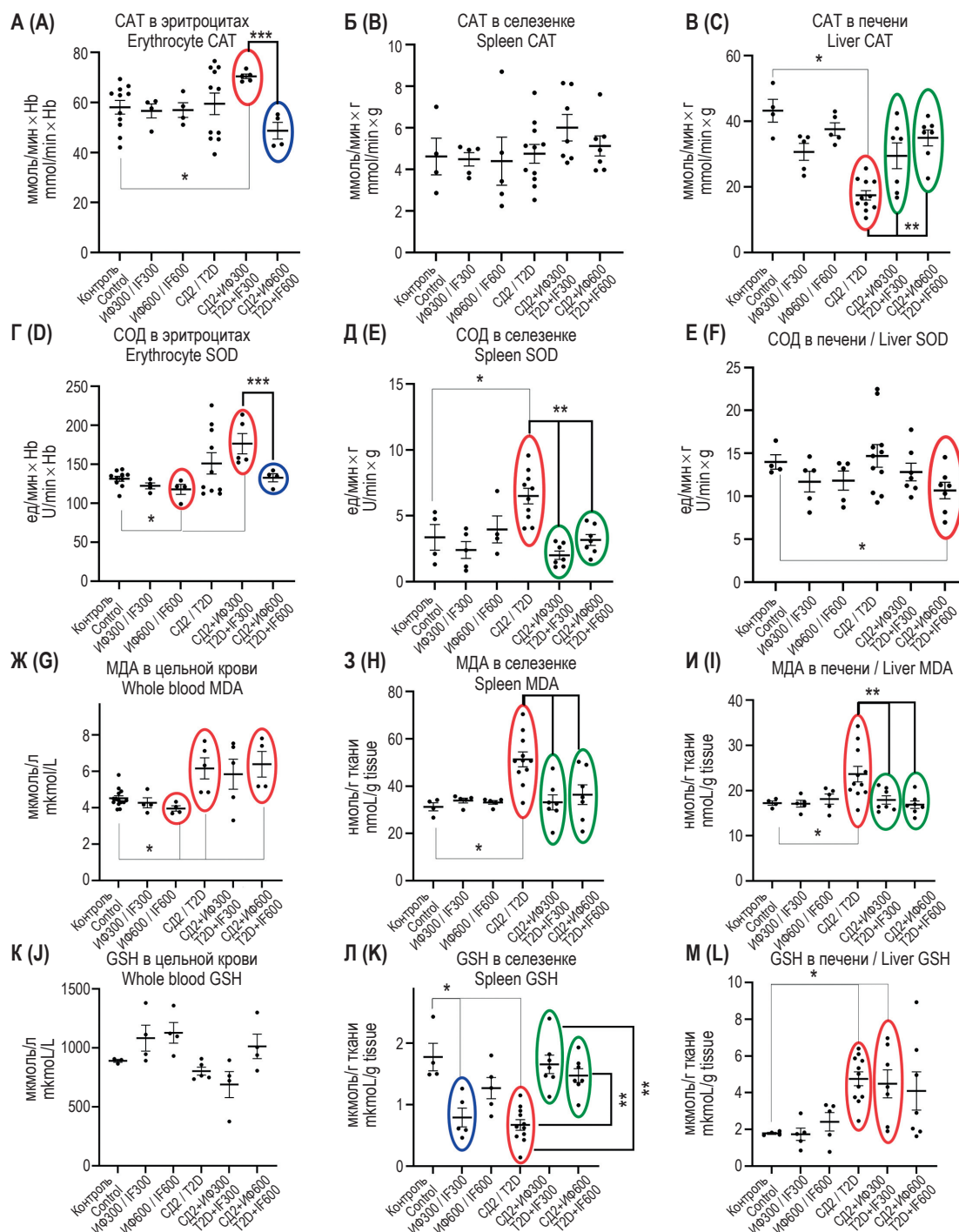


Рисунок 2. Влияние изофлавонов красного клевера (*Trifolium pratense*) на показатели системы ПОЛ-АОЗ в крови и органах у крыс с экспериментальным СД2

Примечание. СД2 – экспериментальный сахарный диабет 2-го типа; ИФ – изофлавоны; ИФ300 и ИФ600 – дозы ИФ 300 и 600 мг/кг соответственно; CAT – активность каталазы; СОД – активность супероксиддисмутазы; MDA – уровень малонового диальдегида; GSH – содержание восстановленного глутатиона. * – $p < 0,05$ в сравнении с контрольной группой здоровых животных; ** – $p < 0,05$ в сравнении с группой животных с СД2; *** – $p < 0,05$ в сравнении с группой животных СД2 + ИФ600. Красным овалом отмечено отличие показателя от здорового контроля, зеленым – отличие от СД2 при приеме ИФ, синим – отличие между животными с СД2, получавшими разные дозы ИФ.

Figure 2. Effect of red clover (*Trifolium pratense*) isoflavones on the LPO-AOD system parameters in the blood and organs of rats with experimental T2D

Note. T2D, experimental diabetes type 2; IF, isoflavones; IF300 and IF600, doses of IF of 300 and 600 mg/kg, respectively; CAT, catalase activity; SOD, superoxide dismutase activity; MDA, malondialdehyde level; GSH, reduced glutathione content. *, $p < 0.05$ compared to the control group of healthy animals; **, $p < 0.05$ in comparison with the control group of animals with T2D; ***, $p < 0.05$ compared to animals with T2D + IF600. The red oval shows the difference from the healthy control, the green one shows the difference between T2D and T2D + IF, and the blue one shows the difference between animals with T2D that received different doses of IF.

цитов в крови (рис. 1В-Е), что можно объяснить иммунологической недостаточностью, развивающейся вследствие дисфункции селезенки в условиях ОС при СД2. Введение ИФ в обеих исследуемых дозах восстанавливало количество моноцитов и гранулоцитов в крови (рис. 1Д, Е).

Для исследования показателей ПОЛ-АОЗ в тканях были выбраны селезенка — орган иммунной системы, и печень — орган, интегрирующий обмен белков, липидов, углеводов и ответственный за обезвреживание эндогенных и экзогенных токсикантов. У крыс с экспериментальным СД2 содержание МДА возрастало во всех 3 исследованных биологических материалах — в крови, печени и селезенке (рис. 2Ж-И). В селезенке увеличивалась активность СОД (рис. 2Д) и снижался уровень GSH (рис. 2Л), в печени снижалась активность САТ (рис. 2В) и увеличивалось содержание GSH (рис. 2М).

Введение ИФ животным с СД2 нормализовало активность САТ в печени (рис. 2В), активность СОД в селезенке (рис. 2В, Д) уровень МДА в селезенке и печени (рис. 2З, И), содержание GSH в селезенке (рис. 2Л) до показателей здорового контроля вне зависимости от вводимой дозы.

Кроме того, при введении здоровым животным ИФ в дозе 300 мг/кг отмечено снижение уровня GSH в селезенке по сравнению с показателями контрольных животных. Напротив, в печени мы наблюдаем тенденцию к увеличению содержания GSH во всех экспериментальных группах (рис. 2М). Содержание GSH в органе является результатом соотношения скорости процессов его синтеза и расходования, которые, в свою очередь, зависят от количества продуктов перекисного окисления, образующихся под действием стресса. Печень является основным местом продукции GSH в организме и его количество в печени отражает потребности

в глутатионе всего организма, что, вероятно, обуславливает высокое содержание GSH в печени при любой стрессовой ситуации, будь то развитие СД2 или манипуляции, связанные с пероральным введением ИФ.

Отдельно стоит отметить, что различный эффект от введения ИФ в разных дозах наблюдался при оценке активности САТ и СОД в эритроцитах, при этом активность ферментов у крыс с СД2 при введении дозы 600 мг/кг была на уровне здорового контроля.

Практической ценностью работы являются новые экспериментальные данные, характеризующие состояние системы перекисного окисления липидов-антиоксидантной защиты в селезенке и печени при введении экстрактов ИФ цветков красного клевера (*Trifolium pratense*) крысам с экспериментальным диабетом 2-го типа, а также демонстрация иммунофармакологического действия данных экстрактов, заключающегося в ослаблении оксидативного стресса в селезенке в модели диабета 2-го типа.

Выводы

1. Экспериментальный СД2 способствует развитию ОС в тканях селезенки и печени.
2. Экстракты ИФ цветков красного клевера (*Trifolium pratense*) способствуют ослаблению оксидативного стресса в селезенке и печени, снижению гликемии и восстановлению числа моноцитов и гранулоцитов в крови.
3. Влияние экстрактов ИФ красного клевера (*Trifolium pratense*) на активность ферментов АОЗ СОД и каталазы в крови отличается в зависимости от вводимой дозы, введение в дозе 600 мг/кг нормализует активность данных ферментов, при введении в дозе 300 мг/кг этого не наблюдается.

Список литературы / References

1. Вольхина И.В., Бутолин Е.Г. Оксидативный стресс и изменения показателей обмена сialogликоконъюгатов печени крыс с аллоксановым сахарным диабетом // Сахарный диабет, 2022. Т. 25, № 3. С. 249-255. [Volkhina I.V., Butolin E.G. Oxidative stress and changes in liver sialoglycoconjugate metabolic parameters in rats with alloxanic diabetes mellitus. *Sakharnyy diabet = Diabetes Mellitus*, 2022, Vol. 25, no. 3, pp. 249-255. (In Russ.)]
2. Емельянов В.В., Гетте И.Ф., Данилова И.Г., Сидорова Л.П., Цейтлер Т.А., Мухлынина Е.А. Влияние соединения класса 1,3,4-тиадиазинов на выраженность окислительного стресса при экспериментальном сахарном диабете 2 типа // Химико-фармацевтический журнал, 2023. Т. 57, № 3. С. 20-24. [Emelianov V.V., Gette I.F., Danilova I.G., Sidorova L.P., Zeitler T.A., Mukhlynina E.A. Effect of 1,3,4-thiadiazine class compounds on the severity of oxidative stress in experimental type 2 diabetes mellitus. *Khimiko-farmatsevticheskiy zhurnal = Chemical and Pharmaceutical Journal*, 2023, Vol. 57, no. 3, pp. 20-24. (In Russ.)]
3. Соколова К.В., Гетте И.Ф., Туканов Д.А., Данилова И.Г. Особенности оксидативного стресса в печени и селезенке крыс при экспериментальном сахарном диабете 2 типа // Вестник уральской медицинской академической науки, 2024. Т. 21, № 5. С. 565-573. [Sokolova K.V., Gette I.F., Tukanov D.A., Danilova I.G. Peculiarities of oxidative stress in the liver and spleen of rats with experimental type 2 diabetes mellitus. [Online] *Vestnik uralskoy meditsinskoy akademicheskoy nauki = Journal of Ural Medical Academic Science*, 2024, Vol. 21, no. 5, pp. 565-573. (In Russ.)]

4. Aboushanab S.A., Shevyrin V.A., Melekhin V.V., Andreeva E.I., Makeev O.G., Kovaleva E.G. Cytotoxic Activity and Phytochemical Screening of Eco-Friendly Extracted Flavonoids from *Pueraria montana* var. *lobata* (Willd.) Sanjappa & Pradeep and *Trifolium pratense* L. Flowers Using HPLC-DAD-MS/HRMS. *AppliedChem*, 2023, Vol. 3, no. 1, pp. 119-140.
5. Akbaribazm M., Khazaei M.R., Khazaei M. Phytochemicals and antioxidant activity of alcoholic/hydroalcoholic extract of *Trifolium pratense*. *Chin. Herb. Med.*, 2020, Vol. 12, iss. 3, pp. 326-335.
6. Bhatti J.S., Sehrawat A., Mishra J., Sidhu I.S., Navik U., Khullar N., Kumar S., Bhatti G.K., Reddy P.H. Oxidative stress in the pathophysiology of type 2 diabetes and related complications: Current therapeutics strategies and future perspectives. *Free Radic. Biol. Med.*, 2022, Vol. 184, pp. 114-134.
7. Caturano A., D'Angelo M., Mormone A., Russo V., Mollica M.P., Salvatore T., Galiero R., Rinaldi L., Vetrano E., Marfella R., Monda M., Giordano A., Sasso F.C. Oxidative Stress in Type 2 Diabetes: Impacts from Pathogenesis to Lifestyle Modifications. *Curr. Issues Mol. Biol.*, 2023, Vol. 45, no. 8, pp. 6651-6666.
8. Dias H.F., Fu J.F., Luck T.G., Wolfe G.E., Hostetter E.R., Ng N.C., Zheng H., Kührtreiber W.M., Price J.C., Catana C., Faustman D.L. The spleen assumes a major role in blood glucose regulation in type 1 diabetes patients treated with BCG. *Sci. Rep.*, 2024, Vol. 14, no. 1, 17611. doi: 10.1038/s41598-024-67905-x.
9. Hanchang W., Wongmanee N., Yoopum S., Rojanaverawong W. Protective role of hesperidin against diabetes induced spleen damage: Mechanism associated with oxidative stress and inflammation. *J. Food Biochem.*, 2022, Vol. 46, no. 12, e14444. doi: 10.1111/jfbc.14444.
10. Janssen L.M.M., Hilgsmann M., Elissen A.M.J., Joore M.A., Schaper N.C., Bosma J.H.A., Stehouwer C.D.A., Sep S.J.S., Koster A., Schram M.T., Evers S.M.A.A. Burden of disease of type 2 diabetes mellitus: cost of illness and quality of life estimated using the Maastricht Study. *Diabet Med.*, 2020, Vol. 37, no. 10, pp. 1759-1765.
11. Masiello P., Broca C., Gross R., Roye M., Manteghetti M., Hillaire-Buys D., Novelli M., Ribes G. Experimental NIDDM: development of a new model in adult rats administered streptozotocin and nicotinamide. *Diabetes*, 1998, Vol. 47, no. 2, pp. 224-229.
12. Mora-Ortiz M., Nuñez Ramos P., Oregioni A., Claus S.P. NMR metabolomics identifies over 60 biomarkers associated with Type II Diabetes impairment in db/db mice. *Metabolomics*, 2019, Vol. 15, no. 6, 89. doi: 10.1007/s11306-019-1548-8.

Авторы:

Соколова К.В. — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории морфологии и биохимии ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук; лаборант кафедры медицинской биохимии и биофизики Института естественных наук и математики ФГАОУ ВО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина», г. Екатеринбург, Россия

Authors:

Sokolova K.V., PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratory of Morphology and Biochemistry, Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences; Laboratory Assistant, Department of Medical Biochemistry and Biophysics, Institute of Natural Sciences and Mathematics, B Yeltsin Ural Federal University, Ekaterinburg, Russian Federation

Туканов Д.А. — аспирант ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук; лаборант-исследователь лаборатории функционального дизайна нанокластерных полиоксиметаллатов Института естественных наук ФГАОУ ВО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина», г. Екатеринбург, Россия

Tukanov D.A., Postgraduate Student, Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences; Laboratory Research Assistant, Laboratory of Functional Design of Nanocluster Polyoxymetallates, Institute of Natural Sciences and Mathematics, B Yeltsin Ural Federal University, Ekaterinburg, Russian Federation

Поступила 29.03.2025
Отправлена на доработку 08.04.2025
Принята к печати 25.05.2025

Received 29.03.2025
Revision received 08.04.2025
Accepted 25.05.2025

ВЛИЯНИЕ ЛЕКАРСТВЕННОГО ТЕСТОСТЕРОНА НА СОДЕРЖАНИЕ RAGE И ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ТРАНСКРИПЦИОННОГО ФАКТОРА NF-κB В ТКАНИ СЕМЕННИКОВ КРЫС ПРИ ДИЕТЕ, ОБОГАЩЕННОЙ ФРУКТОЗОЙ

**Овчинина Н.Г., Уракова М.А., Брындина И.Г., Секунов А.В.,
Протопопов В.А.**

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

Резюме. При сахарном диабете (СД) и метаболическом синдроме (МС) развивается гипогонадизм, связанный со снижением концентрации сывороточного тестостерона. Заместительная терапия тестостероном может быть полезна для коррекции метаболических нарушений, но ее влияние на сперматогенез противоречиво. Длительная гипергликемия способствует накоплению конечных продуктов гликирования в организме. Известно, что клеточные рецепторы к конечным продуктам гликирования (RAGE) запускают воспалительные реакции через провоспалительный транскрипционный фактор NF-κB. Этот сигнальный путь может быть задействован в нарушении сперматогенеза как при гипергликемии, так и при терапии тестостероном. Целью исследования является оценка влияния лекарственного тестостерона на уровни RAGE и NF-κB в тестикулах крыс при СД и МС. Данные получены с помощью вестерн-блоттинга и иммунофлуоресцентного исследования. Эксперименты проведены на молодых крысах. Животные случайным образом были поделены на следующие группы: К (виварный контроль, n = 6), метаболический синдром (МС, n = 5), метаболический синдром + тестостерон (МС + Тн, n = 8), тестостерон (Тн, n = 4). Не установлено достоверных изменений содержания RAGE и NF-κB в тестикулярной ткани крыс при гипергликемии, что может быть связано с недостаточной продолжительностью повышенного уровня глюкозы в организме и с реализацией механизмов, противодействующих активации воспалительного каскада в случае накопления конечных продуктов гликирования. Содержание RAGE в тканях яичек достоверно выше в группах МС + Тн и Тн (вестерн-блоттинг) и в группе МС + Тн (иммунофлуоресцентный метод) как по отношению к контрольной группе, так и по отношению к группе МС. Вероятно, экзогенный тестостерон, в т.ч. на фоне гипергликемии, вызывает повышение содержания RAGE в тестикулярной ткани. Ни в одной из групп не обнаружено достоверных изменений содержания NF-κB в семенни-

Адрес для переписки:

Овчинина Наталья Геннадьевна
ФГБОУ ВО «Ижевская государственная медицинская
академия» Министерства здравоохранения РФ
426056, Россия, Удмуртская Республика, г. Ижевск,
ул. Коммунаров, 281.
Тел./факс: 8 (3412) 65-81-67.
E-mail: ntly.82@mail.ru

Address for correspondence:

Natalya G. Ovchinina
Izhevsk State Medical Academy
281 Kommunarov St
Izhevsk, Udmurt Republic
426056 Russian Federation
Phone/fax: +7 (3412) 65-81-67.
E-mail: ntly.82@mail.ru

Образец цитирования:

Н.Г. Овчинина, М.А. Уракова, И.Г. Брындина,
А.В. Секунов, В.А. Протопопов «Влияние
лекарственного тестостерона на содержание RAGE
и воспалительного транскрипционного фактора
NF-κB в ткани семенников крыс при диете,
обогащенной фруктозой» // Российский
иммунологический журнал, 2025. Т. 28, № 3. С. 469-474.
doi: 10.46235/1028-7221-17184-EOT

© Овчинина Н.Г. и соавт., 2025
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

N.G. Ovchinina, M.A. Urakova, I.G. Bryndina, A.V. Sekunov,
V.A. Protopopov "Effect of testosterone drug on RAGE and
inflammatory transcription factor NF-κB in rat testicular tissue
at the fructose-enriched diet", Russian Journal of Immunology/
Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2025, Vol. 28, no. 3,
pp. 469-474.
doi: 10.46235/1028-7221-17184-EOT

© Ovchinina N.G. et al., 2025
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.46235/1028-7221-17184-EOT

ках. Похоже, что воспалительный каскад, реализуемый с участием этого фактора, не активирован в тестикулах при описанных условиях. Отсутствуют достоверные изменения отношения массы яичек к массе тела и отношения площади просвета к площади стенки семенных канальцев в исследуемых группах. Эти факты свидетельствуют об отсутствии атрофических изменений в семенниках крыс. Гипергликемия в течение 6 недель не вызывает повышения уровня RAGE и NF-κB в семенниках крыс; при введении лекарственного тестостерона повышается содержание RAGE в тестикулах крыс как на фоне гипергликемии, так и в интактном организме; при введении тестостерона, несмотря на повышение RAGE, не реализуется активация NF-κB-зависимого провоспалительного каскада; на фоне гипергликемии и, по крайней мере, в течение 4 недель лекарственного воздействия тестостероном не возникают атрофические изменения в тестикулярной ткани крыс.

Ключевые слова: RAGE, NF-κB, яички, тестостерон, метаболический синдром, гипергликемия

EFFECT OF TESTOSTERONE DRUG ON RAGE AND INFLAMMATORY TRANSCRIPTION FACTOR NF-κB IN RAT TESTICULAR TISSUE AT THE FRUCTOSE-ENRICHED DIET

Ovchinina N.G., Urakova M.A., Bryndina I.G., Sekunov A.V., Protopopov V.A.

Izhevsk State Medical Academy, Izhevsk, Udmurt Republic, Russian Federation

Abstract. Hypogonadism develops in diabetes mellitus (DM) and metabolic syndrome (MS). Testosterone replacement therapy may be applied, but its effect on spermatogenesis is controversial. Hyperglycemia promotes accumulation of glycation products. Cellular receptors for advanced glycation end products (RAGE) trigger inflammatory responses via the proinflammatory transcription factor NF-κB. This signaling pathway may be involved in impairment of spermatogenesis in hyperglycemia and during testosterone therapy. Hence, the aim of our study was to evaluate the effect of testosterone on RAGE and NF-κB levels in rat's testicles in DM and MS. The experiments were carried out in young rats. The animals were randomly divided into several groups: K (intact animals, n = 6), metabolic syndrome (MS, n = 5), metabolic syndrome + testosterone treatment (MS + Tn, n = 8), testosterone (Tn, n = 4). Experimental data were obtained using Western blotting and immunofluorescence studies. No significant changes were found in RAGE and NF-κB contents in testicular tissue of rats with hyperglycemia, probably, due to insufficient duration of hyperglycemia and mechanisms that inhibit inflammation. The testicular RAGE content was significantly higher in MS + Tn, and Tn groups (Western blotting), as well as in MS + Tn group (immunofluorescence technique). Testosterone, in presence of hyperglycemia is likely to cause an increase of testicular RAGE content. No significant changes were found in testicular NF-κB contents. It seems that the inflammatory cascade mediated by this factor is not activated in the testicles. No significant changes were found in testicle-to-body mass ratio and of lumen area to wall area of seminiferous tubules ratio. These facts suggest the absence of atrophic changes in rat testes. Hence, the 6-week hyperglycemia does not cause an increase in the RAGE and NF-κB levels in rat testes; testosterone increases the RAGE content in rat testicles, both in presence of hyperglycemia and in the intact animals. Despite the increased RAGE, activation of NF-κB-dependent proinflammatory cascade is not revealed, and testicular atrophy does not occur in rats.

Keywords: RAGE, NF-κB, testes, testosterone, metabolic syndrome, hyperglycemia

Введение

Сахарный диабет (СД) и метаболический синдром (МС) — актуальная проблема современности в связи с распространенностью, в том числе среди мужчин молодого возраста [1]. Известно, что при СД и МС развивается нарушение половой функции, характеризующееся снижением уровня сывороточного тестостерона, наиболее выраженным у сравнительно молодых пациентов, и клиническими проявлениями у части больных в виде снижения либидо и потери эрекции [3, 6, 9].

Проведение заместительной терапии тестостероном (ЗТТ) рассматривается как один из способов коррекции гипогонадизма у таких пациентов. Такая терапия способна смягчать некоторые метаболические нарушения [13], снижать риск развития сахарного диабета 2 типа [3], в то время как данные о восстановлении сексуальной функции более противоречивы: в частности, указывается возможность неблагоприятного влияния ЗТТ на сперматогенез [7, 10].

Роль клеточных рецепторов к конечным продуктам гликирования (RAGE — Receptor of Advanced Glycation End products) весьма разнообразна и неоднозначна в разных тканях и в контексте разных заболеваний и неблагоприятных воздействий [13]. Участие этих рецепторов и активируемого RAGE сигнального пути с возрастом и воспалением фактора транскрипции NF-κB в функционировании сперматозоидов при гипергликемии и действии экзогенного тестостерона остаются не до конца ясными. Возможно, RAGE могут принимать участие в нарушении половой функции у описанной категории пациентов, так как было доказано, что окислительный стресс и воспаление не только нарушают сперматогенез, но и повреждают сперматозоиды [8].

Целью исследования является оценка влияния лекарственного тестостерона на уровни RAGE и NF-κB в тестикулах крыс при СД и МС.

Материалы и методы

Эксперименты были проведены на беспородных белых крысах-самцах массой 200–250 г. Возраст крыс — 12 недель. Была использована наиболее воспроизводимая экспериментальная модель МС [4] с добавлением 20%-ного раствора фруктозы в течение 6 недель к высококалорийной диете. Кроме того, некоторым животным вводился лекарственный препарат тестостерона (омнадрен (смесь эфиров тестостерона), Pharmaceutical Works JELFA, S.A., Польша) в дозе 4 мг/кг/сут подкожно, в течение 4 недель [5]. Животных содержали в стандартных условиях вивария. При выполнении экспериментов руководствовались правилами проведения работ на экспериментальных животных (Приложение к Приказу Минздрава России от 19.06.2003 № 267). После воздействия у животных под наркозом комбинацией тилетамина и золазепама в соотношении 1:1 (Zoletil, Virbac, Франция; в дозе 10 мг/кг, 0,1 мл) извлекали семенники и замораживали их в жидком азоте, после чего хранили при температуре — 80 °С. Для получения гомогената 30–40 мг замороженной ткани семенников измельчали в гомогенизаторе Ultra Turrax (IKA T 10 basic, Германия), с последующим погружением в холодный буфер, содержащий 150 мМ NaCl; 50 мМ Трис-HCl; pH = 7,4; 1,2 мМ ЭДТА с добавлением Na₃VO₄ 20 мкл/мл; DTT 4 мкл/мл; PMSF 20 мкл/мл; аprotинин 5 мкл/мл; лейпептин 5 мкл/мл; пепстатин А 5 мкл/мл; Phosphatase Inhibitor Cocktail В 40 мкл/мл из расчёта 100 мкл буфера на одну пробу. В последующем проводили гомогенизацию и центрифугирование для получения супернатанта (в течение 10 мин при температуре 4 °С и 12 000 g).

Концентрация белка в надосадочной жидкости определялась методом Bradford на спектро-

фотометре UV-3600 (Shimadzu, Япония) с использованием растворов бычьего сывороточного альбумина (BSA) разной концентрации в качестве стандартных. Исследуемые образцы были выравнены по содержанию белка и хранились при -20 °С для последующего анализа методом вестерн-блоттинга.

Вестерн-блоттинг

Предварительно подготовленные образцы вводились в 4–12%-ный полиакриламидный гель, затем осуществлялся электрофорез в мини-системе Bio-Rad (США) в течение 40–60 мин при 100 В. Затем проводился перенос белков на нитроцеллюлозную мембрану (Bio-Rad, США) в системе mini Trans-Blot (Bio-Rad, США) в течение 1 ч при напряжении 100 В с постоянным охлаждением. Чтобы удостовериться в равном переносе белка из геля на мембрану, нитроцеллюлозная мембрана была окрашена Ponceau S. Затем проводилось блокирование мембраны в 4%-ном растворе BSA в TBS-T (TBS (TRIS-buffered saline) + 0,1 % Tween 20) при комнатной температуре в течение часа. Следующим этапом являлась инкубация мембраны с антителами кролика к белку RAGE (1:1000; Affinity Biosciences, США) и NF-κB (1:1000; Affinity Biosciences, США) в течение ночи при 4 °С. После этого отмывали мембраны в TBST 5 раз по 5 мин. Затем мембраны инкубировали в течение 1 ч с вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена (Goat Anti-Rabbit IgG (H + L) HRP, 1:5000; Affinity Biosciences, США). Далее проводили отмывку в TBST 5 раз по 5 мин. Детекцию мембранных полос проводили с помощью 3,3-диаминобензидина (DAB, diaminobenzidine). Для анализа полученных изображений использовали Image Lab (Bio-Rad, США). Полученный от белковых полос сигнал был нормализован к референсному белку GAPDH (антитела в разведении 1:5000, Affinity Biosciences, США).

Иммунофлуоресцентное исследование

Для иммунофлуоресцентного исследования из замороженных препаратов были приготовлены срезы толщиной 15 мкм с помощью микротомы HM525 NX Cryostat (Thermo Fisher Scientific, США), которые перемещались на предметные стёкла Superfrost Plus (Thermo Fisher Scientific, США). В последующем срезы фиксировались 4%-ным раствором параформальдегида, приготовленного на фосфатно-солевом буфере (PBS, phosphate-buffered saline: 3,2 мМ NaH₂PO₄, 0,5 мМ K₂HPO₄, 1,3 мМ KCl, 135 мМ NaCl, pH = 7,4). После фиксации проводилась 3-кратная отмывка срезов буферным раствором (PBS) с последующей инкубацией в течение 60 мин. во влажной камере с раствором 1%-ного Тритона-X100 и 5%-ного раствор BSA. Затем на срезы были нанесены растворы антител кролика, специфичных к RAGE (1:200, Affinity Biosciences, США), с последующей инкубацией

в течение 1 суток и троекратной отмывкой в PBS. Следующим этапом выполнялась инкубация среза с раствором вторичных антител Alexa Fluor 488 (goat IgG, 1:300; Abscam, Великобритания) 1 часа при комнатной температуре без доступа к свету с последующей отмывкой. Ядра клеток окрашивали DAPI (Abscam, Великобритания).

Получение изображений осуществлялось при использовании устройства DS-Fi3 EF-2E, установленного на микроскоп Nikon Eclipse E200 (Nikon, Япония); для анализа полученных изображений использовалась программа ImageJ.

Площадь просвета и стенки семенных канальцев оценивали в пикселях, затем вычисляли их отношение.

Статистическую обработку проводили в SPSS Statistica 22.0 (IBM Corp., США). Данные представлены в виде $M \pm m$, медианы, 25% и 75% квартилей, наименьшего и наибольшего значений. Для оценки статистической значимости различий в группах применяли критерий Манна–Уитни; различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

У всех крыс с моделированным МС развивалась гипергликемия ($9,3 \pm 0,11$ ммоль/л), но увеличение массы тела зарегистрировано не у всех животных ($281,6 \pm 23,2$ г).

Оценка содержания RAGE в ткани яичек разных исследуемых групп была проведена с помощью иммуноблоттинга и иммунофлуоресцентного окрашивания замороженных срезов ткани.

В нашем исследовании не установлено достоверных изменений содержания RAGE и NF-κB в тестикулярной ткани крыс при гипергликемии, хотя в литературе встречаются данные о повышении экспрессии RAGE при метаболическом синдроме в таких клетках, как эндотелий, сосудистые гладкомышечные клетки, иммунные клетки и др. [2, 12]. По-видимому, гипергликемия не вызывает, по крайней мере в течение некоторого времени, повышение экспрессии RAGE, что может быть обусловлено ограничением запуска воспалительного каскада, апоптоза и других последствий активации RAGE-инициируемых сигнальных путей в условиях временной гипергликемии, например, благодаря слушиванию RAGE с поверхности клеток и образованию растворимых форм рецептора (sRAGE), которые могут выступать в качестве рецепторов-ловушек конечных продуктов гликирования (AGEs — Advanced Glycation End products), как описано в некоторых источниках [11, 12].

Сравнительный анализ результатов вестерн-блоттинга показал, что содержание RAGE в тканях яичек исследуемых животных достоверно выше в группах МС + Тн и Тн как по отношению к контрольной группе, так и по отношению к

группе МС (рис 1). Этот факт наводит на мысль, что экзогенный тестостерон, в т.ч. на фоне гипергликемии, вызывает повышение содержания RAGE в тестикулярной ткани. Предполагалось, что увеличение RAGE может привести к активации провоспалительного сигнального пути, опосредованного NF-κB, однако ни в одной из групп не обнаружено достоверных изменений содержания провоспалительного транскрипционного фактора NF-κB в семенниках (рис. 1). Вероятно, воспалительный каскад, реализуемый с участием этого фактора, не активирован в тестикулах при описанных условиях.

По данным иммунофлуоресцентного исследования оказалось, что интенсивность свечения RAGE в семенных канальцах достоверно выше в группе крыс, которым вводился тестостерон по сравнению с другими группами (рис. 2), что подтверждает результат вестерн-блоттинга.

При анализе отношения площади просвета к площади стенки семенных канальцев достоверного изменения этого показателя в исследуемых группах не отмечено, что свидетельствует об отсутствии атрофии тестикулярной ткани (рис. 2). Также не получено достоверных изменений отношения массы яичек к массе тела ($K - 0,011 \pm 0,002$; $MC - 0,010 \pm 0,003$; $MC + Tn - 0,013 \pm 0,006$, $Tn - 0,009 \pm 0,003$).

Заключение

Таким образом, предварительные результаты нашего исследования демонстрируют повышение содержания RAGE при отсутствии увеличения провоспалительного транскрипционного фактора NF-κB в ткани семенников при введении тестостерона, что может являться одним из патогенетических механизмов нарушения сперматогенеза, не связанных с активацией воспалительного каскада через NF-κB, при заместительной терапии тестостероном, в том числе у лиц с СД и МС.

Выводы

1. Гипергликемия в течение 6 недель не вызывает повышения уровня RAGE и NF-κB в семенниках крыс.
2. При введении лекарственного тестостерона повышается содержание RAGE в тестикулах крыс как на фоне гипергликемии, так и в интактном организме.
3. При введении тестостерона, несмотря на повышение RAGE, не реализуется активация NF-κB-зависимого провоспалительного каскада.
4. На фоне гипергликемии и, по крайней мере, в течение 4 недель лекарственного воздействия тестостероном не возникают атрофические изменения в тестикулярной ткани крыс.

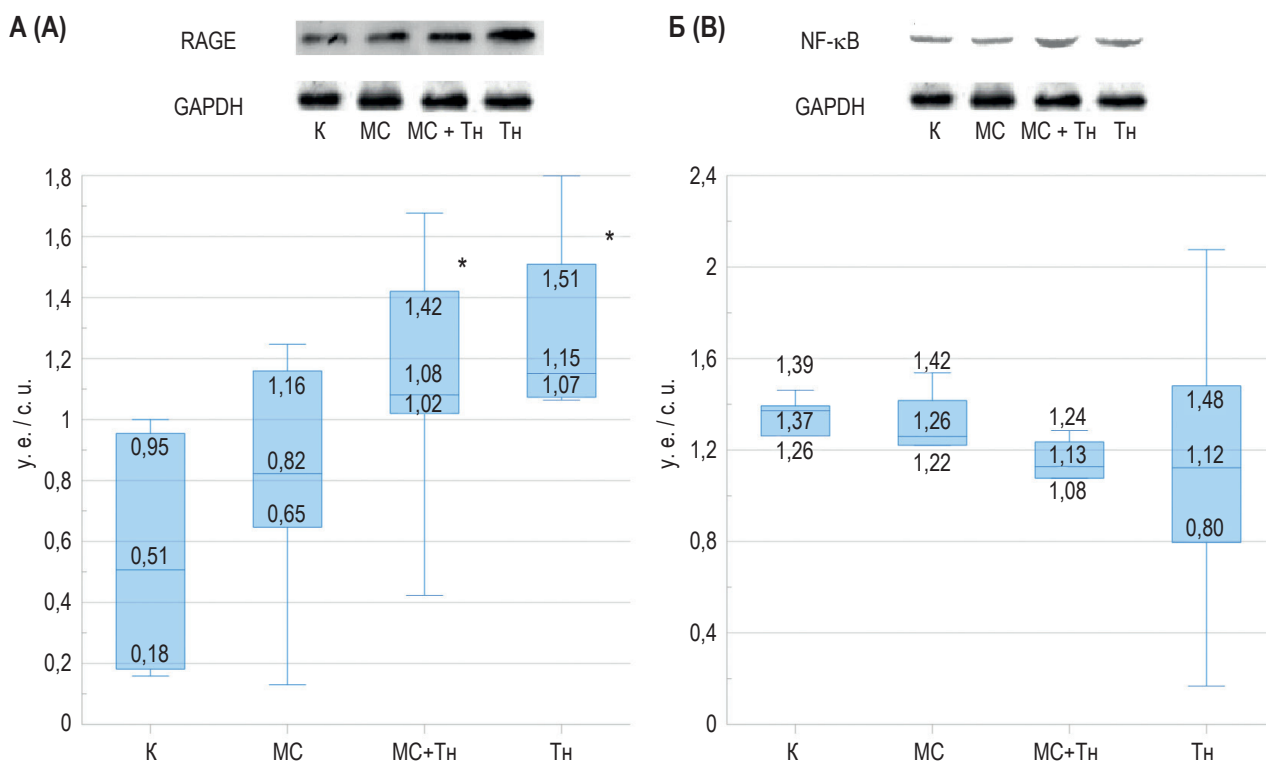


Рисунок 1. RAGE (A) и NF-κB (Б) в гомогенатах ткани яичек крыс (вестерн-блоттинг)

Примечание. К – контроль, MC – метаболический синдром, Tn – тестостерон. * – различия статистически значимы при сравнении с группой контроля и метаболического синдрома.

Figure 1. RAGE (A) and NF-κB (B) in rat testicular tissue homogenates (Western blotting)

Note. C, control; MS, metabolic syndrome; Tn, testosterone. *, differences are statistically significant when compared with the control and metabolic syndrome groups.

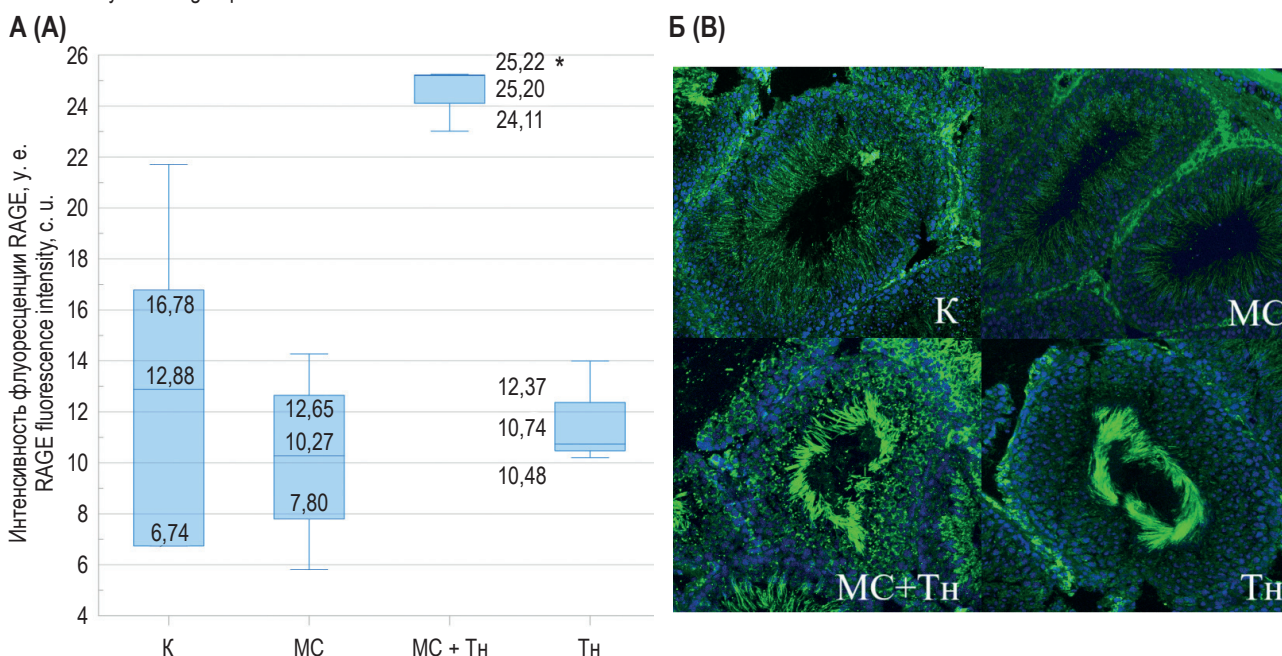


Рисунок 2. Иммунофлуоресцентное исследование RAGE в ткани семенников крыс

Примечание. К – контроль, MC – метаболический синдром, Tn – тестостерон. А – интенсивность флуоресценции семенных канальцев. * – различия статистически значимы при сравнении с другими группами. Б – микрофотографии семенников, увеличение ×40. Ядра клеток – синее свечение (DAPI), RAGE – зеленое свечение.

Figure 2. Immunofluorescence study of RAGE in rat testicular tissue

Note. C, control; MS, metabolic syndrome; Tn, testosterone. A, fluorescence intensity of seminiferous tubules, *, differences are statistically significant when compared with other groups. B, micrographs of testicles, magnification ×40. Cell nuclei – blue glow (DAPI), RAGE – green glow.

Список литературы / References

1. Успенская Ю.А., Комлева Ю.К., Пожиленкова Е.А., Салмин В.В., Лопатина О.Л., Фурсов А.А., Лаврентьев П.В., Белова О.А., Салмина А.Б. Лиганды RAGE-белков: роль в межклеточной коммуникации и патогенезе воспаления // Вестник Российской академии медицинских наук, 2015. Т. 70, № 6. С. 694-703. [Uspenskaya Yu.A., Komleva Yu.K., Pozhilenkova E.A., Salmin V.V., Lopatina O.L., Fursov A.A., Lavrentiev P.V., Belova O.A., Salmina A.B. Ligands of RAGE-Proteins: Role in Intercellular Communication and Pathogenesis of Inflammation. *Vestnik Rossiyskoy akademii meditsinskikh nauk = Annals of the Russian Academy of Medical Sciences*, 2015, Vol. 70, no. 6, pp. 694-703. (In Russ.)]
2. Bierhaus A., Nawroth P.P. Multiple levels of regulation determine the role of the receptor for AGE (RAGE) as common soil in inflammation, immune responses and diabetes mellitus and its complications. *Diabetologia*, 2009, Vol. 52, no. 11, pp. 2251-2263.
3. Caliber M., Saad F. Curr Opin Testosterone therapy for prevention and reversal of type 2 diabetes in men with low testosterone. *Curr. Opin. Pharmacol.*, 2021, Vol. 58, pp. 83-89.
4. Chan A.M.L., Ng A.M.H., Mohd Yunus M.H., Idrus R.B.H., Law J.X., Yazid M.D., Chin K.Y., Shamsuddin S.A., Lokanathan Y. Recent Developments in Rodent Models of High-Fructose Diet-Induced Metabolic Syndrome: A Systematic Review. *Nutrients*, 2021, Vol. 13, no. 8, 2497. doi: 10.3390/nu13082497.
5. Cheng Y.S., Dai D.Z., Ji H., Zhang Q., Dai Y. Sildenafil and FDP-Sr attenuate diabetic cardiomyopathy by suppressing abnormal expression of myocardial CASQ2, FKBP12.6, and SERCA2a in rats. *Acta Pharmacol. Sin.*, 2011, Vol. 32, no. 4, pp. 441-448.
6. Corona G., Vena W., Pizzocaro A., Vignozzi L., Sforza A., Maggi M. Testosterone therapy in diabetes and pre-diabetes. *Andrology*, 2023, Vol. 11, no. 2, pp. 204-214.
7. Desai A., Yassin M., Cayetano A., Tharakan T., Jayasena C.N., Minhas S. Understanding and managing the suppression of spermatogenesis caused by testosterone replacement therapy (TRT) and anabolic-androgenic steroids (AAS). *Ther. Adv. Urol.*, 2022, Vol. 14:17562872221105017. doi: 10.1177/17562872221105017.
8. Dutta S., Majzoub A., Agarwal A. Oxidative stress and sperm function: a systematic review on evaluation and management. *Arab. J. Urol.*, 2019, Vol. 17, no. 2, pp. 87-97.
9. Ebrahimi F., Christ-Crain M. Metabolic syndrome and hypogonadism – two peas in a pod. *Swiss Med. Wkly*, 2016, Vol. 146:w14283. doi: 10.4414/sm.w.2016.14283.
10. Kang J., Chen R., Tharakan T., Minhas S. Novel androgen therapies including selective androgen receptor modulators. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2022, Vol. 36, no. 5, 101686. doi: 10.1016/j.beem.2022.101686.
11. Wang Y., Wang H., Piper M.G., McMaken S., Mo X., Opalek J., Schmidt A.M., Marsh C.B. sRAGE induces human monocyte survival and differentiation. *J. Immunol.*, 2010, Vol. 185, no. 3, pp. 1822-1835.
12. Yan S.F., Ramasamy R., Schmidt A.M. Soluble RAGE: therapy and biomarker in unraveling the RAGE axis in chronic disease and aging. *Biochem. Pharmacol.*, 2010, Vol. 79, no. 10, pp. 1379-1386.
13. Zhang J., Li X., Cai Z., Li H., Yang B. Association between testosterone with type 2 diabetes in adult males, a meta-analysis and trial sequential analysis. *Aging Male*, 2020, Vol. 23, no. 5, pp. 607-618.

Авторы:

Овчинина Н.Г. — к.м.н., доцент кафедры патологической физиологии и иммунологии ФГБОУ ВО «Ижевская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения РФ, г. Ижевск, Удмуртская Республика, Россия

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

Брындина И.Г. — д.м.н., профессор, заведующая кафедрой патологической физиологии и иммунологии ФГБОУ ВО «Ижевская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения РФ, г. Ижевск, Удмуртская Республика, Россия

Секунов А.В. — к.м.н., ассистент кафедры патологической физиологии и иммунологии ФГБОУ ВО «Ижевская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения РФ, г. Ижевск, Удмуртская Республика, Россия

Протопопов В.А. — ассистент кафедры патологической физиологии и иммунологии ФГБОУ ВО «Ижевская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения РФ, г. Ижевск, Удмуртская Республика, Россия

Authors:

Ovchinina N.G., PhD, (Medicine), Associate Professor, Department of Pathological Physiology and Immunology, Izhevsk State Medical Academy, Izhevsk, Udmurt Republic, Russian Federation

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

Bryndina I.G., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Pathological Physiology and Immunology, Izhevsk State Medical Academy, Izhevsk, Udmurt Republic, Russian Federation

Sekunov A.V., PhD (Medicine), Assistant Professor, Department of Pathological Physiology and Immunology, Izhevsk State Medical Academy, Izhevsk, Udmurt Republic, Russian Federation

Protopopov V.A., Assistant Professor, Department of Pathological Physiology and Immunology, Izhevsk State Medical Academy, Izhevsk, Udmurt Republic, Russian Federation

Поступила 29.03.2025
Отправлена на доработку 08.04.2025
Принята к печати 25.05.2025

Received 29.03.2025
Revision received 08.04.2025
Accepted 25.05.2025

ЭФФЕКТ СОВМЕСТНОГО ВЛИЯНИЯ МЕТОТРЕКСАТА С ФИТОЭКСТРАКТАМИ КЛЕВЕРА И ЦИКОРИЯ НА ПРОДУКЦИЮ ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ *IN VITRO*

Михайлова И.В., Чайникова И.Н., Иванова Е.В., Синеговец А.А.

ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ,
г. Оренбург, Россия

Резюме. Одним из аспектов ограничения токсичности метотрексата (MTX) является использование средств растительного происхождения, для которых характерны такие свойства, как доступность, безопасность и высокая биологическая активность в сочетании с очень низкой токсичностью. Среди лекарственных растений, содержащих большой комплекс биологически активных веществ полифенольной природы и обладающих антиоксидантными, противовоспалительными, иммунокорригирующими и другими свойствами, следует выделить клевер луговой и цикорий обыкновенный. Фитоэкстракты, полученные из данных растений, могут быть использованы для защиты в отношении иммунодепрессивного влияния MTX и усиления его противовоспалительных свойств без индукции токсичности MTX. В то же время необходимо отметить, что сведения о механизмах противовоспалительной активности индивидуальных фитоэкстрактов носят разнонаправленный характер. Цель работы — оценка влияния фитоэкстрактов клевера и цикория на секрецию провоспалительных цитокинов TNF α , IL-6 и IL-17 мононуклеарными клетками периферической крови человека при MTX-индуцированной иммуносупрессии. Сухие экстракты из травы клевера и травы цикория были получены методом перколяции с этиловым спиртом. Продукцию цитокинов TNF α , IL-6 и IL-17 в супернатантах нестимулированных и стимулированных конканавалином А (Кон А) культур мононуклеарных клеток периферической крови человека оценивали с использованием метода иммуноферментного анализа. Оценка иммунорегуляторной активности сухих экстрактов из травы клевера и цикория, а также их сочетаний с MTX на модели мононуклеаров периферической крови человека показала, что фитоэкстракты подавляли продукцию провоспалительных цитокинов в системе *in vitro* как спонтанную (TNF α , IL-6), так и индуцированную (TNF α , IL-6 и IL-17). Следует отметить, что выраженность ингибирующего эффекта фитоэкстрактов не уступала, а в отношении отдельных цитокинов (TNF α и IL-17) превосходила фитопрепарат «Иммунал». Установлено ингибирующее влияние фитоэкстрактов клевера и цикория, а также их сочетаний с MTX на продукцию провоспалительных

Адрес для переписки:

Синеговец Ангелина Анатольевна
ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ
460000, Россия, г. Оренбург, ул. Советская, 6.
Тел.: 8 (922) 845-07-00.
E-mail: a.a.sinegovets@yandex.ru

Address for correspondence:

Angelina A. Sinegovets
Orenburg State Medical University
6 Sovetskaya St
Orenburg
460000 Russian Federation
Phone: +7 (922) 845-07-00.
E-mail: a.a.sinegovets@yandex.ru

Образец цитирования:

И.В. Михайлова, И.Н. Чайникова, Е.В. Иванова, А.А. Синеговец «Эффект совместного влияния метотрексата с фитоэкстрактами клевера и цикория на продукцию провоспалительных цитокинов *in vitro*» // Российский иммунологический журнал, 2025. Т. 28, № 3. С. 475-480.
doi: 10.46235/1028-7221-17163-CEO

© Михайлова И.В. и соавт., 2025
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

I.V. Mikhailova, I.N. Chaynikova, E.V. Ivanova, A.A. Sinegovets "Combined effect of methotrexate and phytoextracts of meadow clover and common chicory on the *in vitro* production of pro-inflammatory cytokines", Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2025, Vol. 28, no. 3, pp. 475-480.
doi: 10.46235/1028-7221-17163-CEO

© Mikhailova I.V. et al., 2025
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.46235/1028-7221-17163-CEO

цитокинов мононуклеарными лейкоцитами периферической крови человека — TNF α , IL-6, IL-17. Показано потенцирующее влияние фитоэкстрактов на усиление ингибирующего эффекта цитостатика MTX в отношении продукции лимфоцитами IL-6 и появление противовоспалительного влияния в отношении TNF α и IL-17. Наиболее выраженным иммунорегуляторным и потенцирующим эффектом в отношении противовоспалительного воздействия MTX обладал фитоэкстракт цикория, при этом оба экстракта превосходили влияние препарата сравнения «Иммунал».

Ключевые слова: метотрексат, фитоэкстракт, клевер, цикорий, цитокины, мононуклеары периферической крови человека

COMBINED EFFECT OF METHOTREXATE AND PHYTOEXTRACTS OF MEADOW CLOVER AND COMMON CHICORY ON THE *IN VITRO* PRODUCTION OF PRO-INFLAMMATORY CYTOKINES

Mikhailova I.V., Chaynikova I.N., Ivanova E.V., Sinegovets A.A.

Orenburg State Medical University, Orenburg, Russian Federation

Abstract. Usage of herbal remedies may present a tool limiting toxicity of methotrexate (MTX). The herbal products are characterized by availability, safety, high biological activity, and very low toxicity. One should highlight the meadow clover and common chicory among medicinal plants containing a variety of biologically active polyphenolic substances, possessing antioxidant, anti-inflammatory, immunocorrective and other favorable properties. Phytoextracts obtained from these plants may be used in order to protect against immunosuppressive effects of MTX and enhance its anti-inflammatory properties without inducing MTX toxicity. At the same time, it should be noted that information on the mechanisms of anti-inflammatory activity of individual phytoextracts is multidirectional. The aim of our work was to evaluate the effect of clover and chicory phytoextracts on secretion of proinflammatory cytokines TNF α , IL-6 and IL-17 by human peripheral blood mononuclear cells under MTX-induced immunosuppression. Dry extracts from clover grass and chicory grass were obtained by percolation with ethyl alcohol. The production of cytokines TNF α , IL-6 and IL-17 in the supernatants of unstimulated and concanavalin A (Con A)-stimulated human peripheral blood mononuclear cell cultures was assessed using the enzyme immunoassay method. Evaluation of immunoregulatory activity of dry extracts from clover and chicory grass, as well as their combinations with MTX using the *in vitro* model of human peripheral blood mononuclear cells showed that the phytoextracts suppressed the production of proinflammatory cytokines in this system, both spontaneous (TNF α , IL-6), and induced (TNF α , IL-6 and IL-17). It should be noted that the degree of inhibitory effect caused by phytoextracts was not inferior, and, in relation to individual cytokines (TNF α and IL-17), was superior to Immunal, an Echinacea-derived preparation. We have revealed inhibitory effects of clover and chicory phytoextracts, as well as their combinations with MTX, on the production of proinflammatory cytokines (TNF α , IL-6, IL-17) by human peripheral blood mononuclear leukocytes. Potentiating action of phytoextracts manifested as enhanced inhibitory effect of cytostatic MTX on the production of IL-6 by lymphocytes and the appearance of an anti-inflammatory effect on TNF α and IL-17. The most pronounced immunoregulatory effect and potentiation of anti-inflammatory MTX action was obtained by the chicory phytoextract, with both extracts exceeding the effect of Immunal, a commercial comparison drug.

Keywords: methotrexate, phytoextract, clover, chicory, cytokines, mononuclears of human peripheral blood

Введение

В последние годы расширяется диапазон заболеваний, при лечении которых метотрексат (MTX) используется как препарат первой линии и/или как основное и дополнительное лекар-

ственное средство. Первоначально разработанный как противоопухолевый препарат, MTX в настоящее время благодаря его противовоспалительному, антиметаболическому, иммуномодулирующему действию применяется при лечении ревматоидного артрита, ювенильного идиопатического

тического артрита, псориаза, при воспалительных заболеваниях кишечника, рассеянном склерозе, васкулите, системной красной волчанке и многих других заболеваниях соединительной ткани и кожи [7]. Однако одним из факторов, ограничивающих применение МТХ, является его токсическое действие, в том числе способность индуцировать окислительный стресс, гепатотоксичность, нефротоксичность, иммуносупрессию и др. [6, 12].

Одним из аспектов ограничения токсичности подобных препаратов является использование средств растительного происхождения, являющихся доступными, безопасными и обладающими высокой биологической активностью, включая способность потенцировать эффект лечебных препаратов. Клевер луговой (*Trifolium pratense* L.) и цикорий обыкновенный (*Cichorium intybus* L.) и экстракты, полученные из этих растений, содержат большой комплекс биологически активных веществ (БАВ) полифенольной природы, обладающих антиоксидантными, противовоспалительными, иммунокорригирующими и др. свойствами [1, 2, 5]. Вместе с тем разрозненный характер сведений о механизмах противовоспалительной активности индивидуальных фитоекстрактов, связанный с особенностями их выделения, а также очистки и стандартизации фитопрепаратов, ограничивает возможности целенаправленного поиска БАВ с противовоспалительной активностью в используемых и перспективных лекарственных растениях. Следует также отметить, что вопрос о защитном влиянии экстрактов цикория и клевера в отношении иммунодепрессивного влияния МТХ остается открытым. **Целью работы** явилась оценка влияния фитоекстрактов клевера и цикория на секрецию провоспалительных цитокинов TNF α , IL-6 и IL-17 мононуклеарными клетками периферической крови человека при МТХ-индуцированной иммуносупрессии.

Материалы и методы

Объектами исследования послужили сухие экстракты из травы клевера лугового и травы цикория обыкновенного, полученные методом перколяции [3, 4]. Периферические мононуклеарные клетки (ПМК) выделяли из гепаринизированной крови здоровых доноров методом градиентного центрифугирования (400 g) в градиенте плотности фиколл-верографин (Pharmacia, Швеция) плотностью 1,077 г/см³. Базовая (нестимулированная) продукция провоспалительных цитокинов TNF α , IL-6 и IL-17 исследовалась в культуре мононуклеаров, сокультивируемых с водными растворами фитоекстрактов (2,0 мг/мл) с добавлением МТХ (Sandoz, Словения; лекарственная форма — раствор для инъекций) в концентрации

10,0 мкг/мл (опыт 1) и без МТХ (опыт 2). Для оценки индуцированной продукции исследуемых провоспалительных цитокинов к лимфоцитам добавляли конканавалин А (Кон А) (НПП «ПанЭко», Россия) в концентрации 20,0 мкг/мл. В качестве контроля были использованы пробы, где к периферическим мононуклеарам добавлялась только культуральная среда (контроль 1) или культуральная среда с Кон А (контроль 2). После 24-часовой инкубации клеток (2×10^6) при 37,0 °C в атмосфере 5,0% CO₂ в полной культуральной среде RPMI-1640 с добавлением 10,0% фетальной сыворотки (НПП «ПанЭко», Россия) и 80,0 мкг/мл гентамицина собирали культуральную жидкость и замораживали (-20 °C). Исследования проводили в 3 дублях для каждого исследуемого образца. Уровень спонтанной и индуцированной продукции цитокинов после сокультивирования лимфоцитов с водными растворами фитоекстрактов исследовали методом ИФА (ООО «Цитокин», Россия) с регистрацией результатов на фотометре Multiskan (LabSystems, Финляндия), длина волны 492 нм. Статистическую обработку полученных данных проводили средствами пакета Statistica 10 (StatSoft, США) с оценкой различий между величинами по критерию Манна—Уитни ($p < 0,05$).

Результаты и обсуждение

Оценка иммунорегуляторной активности сухих экстрактов травы клевера и цикория на модели мононуклеаров периферической крови человека показала, что фитоекстракты подавляли продукцию провоспалительных цитокинов в системе *in vitro* как спонтанную (TNF α , IL-6), так и индуцированную (TNF α , IL-6 и IL-17). Следует отметить, что выраженность ингибирующего эффекта фитоекстрактов не уступала, а в отношении отдельных цитокинов (TNF α и IL-17) превосходила фитопрепарат «Иммунал». Так, добавление в среду культивирования ПМК фитоекстракта клевера и цикория сопровождалось снижением базовой и индуцированной продукции ключевого провоспалительного цитокина TNF α в 2 и 4 раза относительно контролей лимфоцитов ($136,5 \pm 13,8$ пг/мл и $239,9 \pm 24,2$ пг/мл соответственно, $p < 0,05$). Напротив, препарат «Иммунал» оказывал стимулирующее влияние на базовую продукцию TNF α ($191,2 \pm 14,5$ пг/мл), не изменяя индуцированную секрецию.

В отношении IL-6 эффекты исследуемых образцов были однонаправленными и характеризовались подавлением базовой и индуцированной продукции цитокина лимфоцитами, но отличались по уровню выраженности влияния. Добавление к периферическим мононуклеарам «Иммунала» приводило к незначительному снижению уровня IL-6 (на 18,0–30,5%) относительно

контролей ($433,7 \pm 16,0$ пг/мл и $469,0 \pm 18,5$ пг/мл соответственно, $p < 0,05$). Внесение в культуральную среду экстракта клевера сопровождалось уменьшением продукции IL-6 в 2 раза у нестимулированных лимфоцитов и в 3 раза у индуцированных клеток. Наиболее сильное ингибирующее влияние на продукцию лимфоцитами цитокина оказывал фитоэкстракт цикория, снижающий уровень IL-6 в 20 раз, независимо от присутствия в среде Кон А.

Содержание другого провоспалительного цитокина IL-17 в культуральной среде нестимулированных лимфоцитов в присутствии обоих фитоэкстрактов и «Иммунала» не отличалось от уровня базовой секреции данного цитокина и соответствовало значениям контроля ($38,3 \pm 4,5$ пг/мл). Вместе с тем внесение исследуемых образцов в среду индуцированных Кон А лимфоцитов приводило к двукратному снижению продукции IL-17 под влиянием «Иммунала» и к двадцатикратному — в присутствии обоих фитоэкстрактов по сравнению с контролем 1 ($631,7 \pm 58,3$ пг/мл, $p < 0,05$).

Анализ сочетанного влияния фитоэкстрактов и «Иммунала» совместно с МТХ позволил установить их ингибирующий эффект в отношении продукции TNF α , IL-6 и IL-17 лимфоцитами, при этом более выраженным потенцирующим действием обладал образец из сухой травы цикория. В предварительных исследованиях было установлено отсутствие влияния самого МТХ в концентрации 10,0 мкг/мл в отношении базовой и стимулированной продукции TNF α и IL-17. Вместе с тем МТХ способствовал снижению уровня IL-6 до $358,0 \pm 29,5$ пг/мл в среде с не стимулированными ПМК и до $367,0 \pm 32,0$ пг/мл — с лимфоцитами, индуцированными Кон А. При внесении в культуральную среду «Иммунала» с МТХ отмечалась синергидность их противовоспалительного эффекта, но только для продукции TNF α и IL-17. В отношении TNF α установлено появление ингибирующего воздействия обоих образцов, для IL-17 — усиление эффекта на два порядка в сравнении с непосредственным влиянием «Иммунала» (с $631,7 \pm 58,3$ пг/мл до $250,1 \pm 21,4$ пг/мл и $130,7 \pm 18,9$ пг/мл соответственно, $p < 0,05$). В отношении базовой и стимулированной продукции IL-6 сочетанный противовоспалительный эффект не отмечался и соответствовал влиянию препаратов в отдельности.

В сочетании с фитоэкстрактом клевера на порядок усиливался противовоспалительный эффект МТХ в отношении базовой и стимулированной продукции TNF α и IL-6 ($p < 0,05$). Для IL-17 ингибирующий эффект соответствовал влиянию отдельно взятому образцу клевера на продукцию индуцированных лимфоцитов. Добавление

к периферическим мононуклеарам цитостатика МТХ с фитоэкстрактом цикория сопровождалось двукратным (в сравнении с контролем лимфоцитов — $77,4 \pm 11,0$ пг/мл и $81,5 \pm 6,5$ пг/мл, $p < 0,05$) снижением продукции TNF α и многократным (в 19-20 раз в сравнении с контролем, $p < 0,05$) подавлением продукции IL-6 и IL-17 как у нестимулированных лимфоцитов, так и индуцированных Кон А.

Таким образом, было установлено ингибирующее влияние фитоэкстрактов клевера и цикория, а также их сочетаний с МТХ на продукцию провоспалительных цитокинов мононуклеарными лейкоцитами периферической крови человека — TNF α , IL-6, IL-17. Показано потенцирующее влияние фитоэкстрактов на усиление ингибирующего эффекта цитостатика МТХ в отношении продукции лимфоцитами IL-6 и появление противовоспалительного влияния в отношении TNF α и IL-17. Наиболее выраженным иммунорегуляторным и потенцирующим эффектом в отношении противовоспалительного воздействия МТХ обладал фитоэкстракт цикория, однако оба экстракта превосходили влияние известного фитопрепарата на основе *Echinacea purpurea* L.

Обсуждая полученные результаты, необходимо отметить, что в ранее проведенных работах было установлено, что исследуемое сырье *Trifolium pratense* L. и *Cichorium intybus* L. и полученные из него экстракты содержат БАВ полифенольной природы — флавоноиды, гидроксикоричные кислоты и фенольные кислоты [2, 5]. Иммунорегуляторная активность фенольных соединений в системах *in vitro* может быть реализована различными механизмами, включая ингибирование воспалительных путей через NF- κ B и STAT3, инфламмасому NLRP3 и, как следствие, снижения экспрессии провоспалительных генов в иммунокомпетентных клетках, уровня флогенных цитокинов, ограничение окислительного стресса [7, 10, 11].

Особый интерес представляет потенциальное использование фитоэкстрактов совместно с МТХ, являющимся золотым стандартом лечения системных иммуновоспалительных заболеваний человека [8, 14]. Полученные в нашей работе данные совпадают с рядом литературных [7], где показано, что МТХ снижает экспрессию TNF α , IL-1 β , а также экспрессию IL-17 и IFN γ в Т-клетках, культивируемых совместно с синовиальными фибробластами при ревматоидном артрите [15]. Лечение МТХ также приводило к снижению продукции провоспалительных моноцитарных/макрофагальных цитокинов (IL-1 β , IL-6 и TNF α), увеличивало экспрессию гена противовоспалительных цитокинов Th2 (IL-4 и IL-10). Предполагают, что основной механизм

влияния на провоспалительные цитокины был связан с преимущественным действием на путь NF-κB, а не через аденозиновые рецепторы. Вместе с тем в других работах показано, что МТХ был полностью неактивен в отношении продукции IL-6 мононуклеарами даже в больших дозах [13]. В серии экспериментов *in vitro* также не было обнаружено ингибирующего влияния МТХ на эффекторные цитокины, но показан выраженный ингибирующий эффект на пролиферацию Т-клеток [9]. Авторы считали, что противовоспалительная эффективность МТХ, вероятно, была опосредована ингибированием пролиферации и выживания активированных провоспалительных CD4 и CD8 Т-клеток. Вместе с тем в литературе отсутствуют сведения о возможном сочетанном провоспалительном эффекте МТХ с экстрактами клевера и цикория, что может способствовать снижению дозы МТХ для получения терапевтического эффекта препарата.

Выводы

1. Установлено ингибирующее влияние фитоэкстрактов клевера и цикория, а также их сочетаний с МТХ на продукцию провоспалительных цитокинов мононуклеарными лейкоцитами периферической крови человека — TNFα, IL-6, IL-17.
2. Показано потенцирующее влияние фитоэкстрактов на усиление ингибирующего эффекта цитостатика МТХ в отношении продукции лимфоцитами IL-6 и появление противовоспалительного влияния в отношении TNFα и IL-17.
3. Наиболее выраженным иммунорегуляторным и потенцирующим эффектом в отношении противовоспалительного воздействия МТХ обладал фитоэкстракт цикория, при этом оба экстракта превосходили влияние препарата сравнения «Иммунал».

Список литературы / References

1. Дренин А.А., Ботиров Э.Х. Флавоноиды и изофлавоноиды растений рода *Trifolium* L. Структурное разнообразие и биологическая активность // Химия растительного сырья, 2017. № 3. С. 39-53. [Drenin A.A., Botirov E.H. Flavonoids and isoflavonoids of plants of the genus *Trifolium* L. Structural diversity and biological activity. *Khimiya rastitel'nogo syrya* = *Chemistry of Plant Raw Materials*, 2017, no. 3, pp. 39-53. (In Russ.)]
2. Михайлова И.В., Синеговец А.А., Бондаренко А.И., Иванова Е.В. Фитохимическая характеристика и антиоксидантные свойства травы клевера лугового, произрастающего на территории Оренбургской области // Медико-фармацевтический журнал «Пульс», 2023, Т. 25, № 1. С. 29-33. [Mikhailova I.V., Sinegovets A.A., Bondarenko A.I., Ivanova E.V. Phytochemical characteristics and antioxidant properties of the herb of meadow clover growing on the territory of the Orenburg region. *Mediko-farmatsevticheskiy zhurnal "Puls"* = *Medical and Pharmaceutical Journal "Pulse"*, 2023, Vol. 25, no. 1, pp. 29-33. (In Russ.)]
3. Михайлова И.В., Иванова Е.В., Синеговец А.А., Смолягин А.И., Кузьмичева Н.А. Способ получения средства, обладающего антиоксидантной и иммуномодулирующей активностью, на основе травы *Trifolium pratense* L. Патент RU 2828665 C1, 15.10.2024. [Mikhailova I.V., Ivanova E.V., Sinegovets A.A., Smolyagin A.I., Kuzmicheva N.A. Method for producing an agent with antioxidant and immunomodulatory activity based on the herb *Trifolium pratense* L. Patent RU 2828665 C1, 15.10.2024].
4. Михайлова И.В., Иванова Е.В., Смолягин А.И., Бондаренко А.А., Синеговец А.А., Кузьмичева Н.А., Филиппова Ю.В., Воронкова И.П., Винокурова Н.В. Способ получения средства, обладающего антиоксидантной и иммуномодулирующей активностью. Патент RU 2803502 C1, 14.09.2023. [Mikhailova I.V., Ivanova E.V., Smolyagin A.I., Bondarenko A.A., Sinegovets A.A., Kuzmicheva N.A., Filippova Yu.V., Voronkova I.P., Vinokurova N.V. Method for producing an agent with antioxidant and immunomodulatory activity. Patent RU 2803502 C1, 14.09.2023].
5. Синеговец А.А., Михайлова И.В., Иванова Е.В., Кузьмичева Н.А. Подбор оптимальных параметров экстрагирования фенольных соединений из травы цикория обыкновенного // Медико-фармацевтический журнал «Пульс», 2023, Т. 25, № 8. С. 58-67. [Sinegovets A.A., Mikhailova I.V., Ivanova E.V., Kuzmicheva N.A. Selection of optimum parameters for extraction of phenolic compounds from the herb of *Cichorium intybus* L. *Mediko-farmatsevticheskiy zhurnal "Puls"* = *Medical and Pharmaceutical Journal "Pulse"*, 2023, Vol. 25, no. 8, pp. 58-67. (In Russ.)]
6. Фролов Б.А., Калинина О.В., Кириллова А.В., Штиль А.А. Преодоление гепатотоксичности метотрексата: роль тритерпеноидов // Клиническая онкогематология, 2013. Т. 6, № 1. С. 1-10. [Frolov B.A., Kalinina O.V., Kirillova A.V., Shtil A.A. Overcoming the hepatotoxicity of methotrexate: the role of triterpenoids. *Klinicheskaya onkogematologiya* = *Clinical Hematology*. 2013, Vol. 6, no. 1, pp. 1-10. (In Russ.)]
7. Bedoui Y., Guillot X., Sélambarom J., Guiraud P., Giry C., Jaffar-Bandjee M.C., Ralandison S., Gasque P. Methotrexate an old drug with new tricks. *Int. J. Mol. Sci.*, 2019, Vol. 20, no. 20, 5023. doi: 10.3390/ijms20205023.
8. Cronstein B.N., Aune T.M. Methotrexate and its mechanisms of action in inflammatory arthritis. *Nat. Rev. Rheumatol.*, 2020, Vol. 16, no. 3, pp. 145-154.

9. Freeman M.L., Clagett B.M., Moisi D., Yeh E., Morris C.D., Ryu A., Rodriguez B., Stein J.H., Deeks S.G., Currier J.S., Hsue P.Y., Anthony D.D., Calabrese L.H., Ribaud H.J., Lederman M.M. Methotrexate inhibits T cell proliferation but not inflammatory cytokine expression to modulate immunity in people living with HIV. *Front. Immunol.*, 2022, Vol. 13, 924718. doi: 10.3389/fimmu.2022.924718.
10. Hosseinzade A., Sadeghi O., Naghdipour Biregani A., Soukhtehzari S., Brandt G.S., Esmailzadeh A. Immunomodulatory effects of flavonoids: possible induction of T CD4+ regulatory cells through suppression of mTOR pathway signaling activity. *Front. Immunol.*, 2019, Vol. 10, 51. doi: 10.3389/fimmu.2019.00051.
11. Martínez G., Mijares M.R., De Sanctis J.B. Effects of flavonoids and its derivatives on immune cell responses. *Recent Pat. Inflamm. Allergy Drug Discov.*, 2019, Vol. 13, no. 2, pp. 84-104.
12. Miyazono Y., Gao F., Horie T. Oxidative stress contributes to methotrexate-induced small intestinal toxicity in rats. *Scand. J. Gastroenterol.*, 2004, Vol. 39, no. 11, pp. 1119-1127.
13. Sakuma S., Kato Y., Nishigaki F., Magari K., Miyata S., Ohkubo Y., Goto T. Effects of FK506 and other immunosuppressive anti-rheumatic agents on T cell activation mediated IL-6 and IgM production *in vitro*. *Int. Immunopharmacol.*, 2001, Vol. 1, no. 4, pp. 749-757.
14. Shinde C.G., Venkatesh M.P., Kumar T.M., Shivakumar H.G. Methotrexate: a gold standard for treatment of rheumatoid arthritis. *J. Pain Palliat. Care Pharmacother.*, 2014, Vol. 28, no. 4, pp. 351-358.
15. Xu W., Wu H., Tahara K., Chen S., Wang X., Tanaka S., Sugiyama K., Sawada T., Hirano T. Effects of vitamin K2 combined with methotrexate against mitogen-activated peripheral blood mononuclear cells of healthy subjects and rheumatoid arthritis patients. *Fundam. Clin. Pharmacol.*, 2021, Vol. 35, no. 5, pp. 832-842.

Авторы:

Михайлова И.В. — д.б.н., доцент, заведующая кафедрой фармацевтической химии ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Оренбург, Россия

Чайникова И.Н. — д.м.н., профессор кафедры нормальной физиологии ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Оренбург, Россия

Иванова Е.В. — д.м.н., доцент кафедры фармацевтической химии ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Оренбург, Россия

Синеговец А.А. — ассистент кафедры фармацевтической химии ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Оренбург, Россия

Authors:

Mikhailova I.V., PhD, MD (Biology), Associate Professor, Head, Department of Pharmaceutical Chemistry, Orenburg State Medical University, Orenburg, Russian Federation

Chaynikova I.N., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Normal Physiology, Orenburg State Medical University, Orenburg, Russian Federation

Ivanova E.V., PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Department of Pharmaceutical Chemistry, Orenburg State Medical University, Orenburg, Russian Federation

Sinegovets A.A., Assistant Professor, Department of Pharmaceutical Chemistry, Orenburg State Medical University, Orenburg, Russian Federation

Поступила 28.03.2025

Отправлена на доработку 18.04.2025

Принята к печати 25.05.2025

Received 28.03.2025

Revision received 18.04.2025

Accepted 25.05.2025

ИММУНОМОРФОМЕТРИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ КРЫС ПРИ ВВЕДЕНИИ ПОЛИОКСОМЕТАЛЛАТОВ

Титова С.А.¹, Гетте И.Ф.², Тонкушина М.О.¹, Остроушко А.А.¹

¹ ФГАОУ ВО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина»,
г. Екатеринбург, Россия

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

Резюме. Действие наночастиц, содержащих оксиды металлов, может вызывать как усиление пролиферации, так и гибель иммунокомпетентных клеток. Полиоксометаллаты (ПОМ) — наночастицы, содержащие оксиды железа (III) и молибдена, предназначенные для направленного транспорта лекарственных препаратов. Наночастицы могут вызывать эффекты, отличающиеся от действия смеси содержащихся в наночастицах соединений. Цель работы — исследовать влияние ПОМ и смеси компонентов ПОМ (дериватов) на морфометрические показатели тимуса, селезенки, количество лейкоцитов крови и их предшественников в костном мозге. Исследование проведено на 25 половозрелых самцах крыс Вистар, поделенных на 5 равных групп: животным в 1 и 2 группах вводили внутримышечно ПОМ однократно и семикратно, животным в 3 и 4 группах вводили дериваты также однократно и семикратно, первая группа оставлена интактной. Однократная доза ПОМ или дериватов составляла 0,15 мг/100 г массы. Подсчитывали корково-мозговой индекс тимуса и морфометрические показатели селезенки (площадь стромы, белой пульпы, лимфоидных фолликулов, ширину мантийной и маргинальной зон лимфоидных фолликулов). На основании морфометрических параметров рассчитывали коэффициенты, используемые для интегральной оценки морфометрических изменений селезенки: стромально-паренхиматозное отношение (СПО), фолликулярный коэффициент (ФК) и лимфоидный коэффициент. Определяли количество лейкоцитов и их фракций в периферической крови, количество предшественников лейкоцитов в костном мозге. При сравнении показателей крыс, получавших ПОМ и дериваты, с параметрами интактных крыс было установлено: отсутствие достоверных различий соотношения коркового и мозгового вещества тимуса; увеличение СПО в группе 3, СПО, ФК и ширины маргинальной зоны в группе 5. В группах 2-5 обнаружена лейкопения за счет дефицита гранулоцитов. При введении дериватов в группах 4-5 также снизилось количество лимфоцитов. В костном мозге в группах 3 и 5 выявлено увеличение количества клеток моноцитарного ряда. Изменение в периферическом органе иммунопереза, а именно гиперплазия лимфатического аппарата селезенки, наблюдается в большей степени при действии отдельных компонентов наночастиц (дериватов), чем при действии ПОМ. Действие ПОМ и дериватов в меньшей степени проявляется в от-

Адрес для переписки:

Гетте Ирина Федоровна
ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии»
Уральского отделения Российской академии наук
620049, Россия, г. Екатеринбург,
ул. Первомайская, 106.
Тел.: 8 (909) 019-53-22.
E-mail: i.goette@yandex.ru

Address for correspondence:

Irina F. Gette
Institute of Immunology and Physiology,
Ural Branch, Russian Academy of Sciences
106 Pervomayskaya St
Ekaterinburg
620049 Russian Federation
Phone: +7 (909) 019-53-22.
E-mail: i.goette@yandex.ru

Образец цитирования:

С.А. Титова, И.Ф. Гетте, М.О. Тонкушина, А.А. Остроушко «Иммуноморфометрические показатели крыс при введении полиоксометаллатов» // Российский иммунологический журнал, 2025. Т. 28, № 3. С. 481-486.
doi: 10.46235/1028-7221-17173-III

© Титова С.А. и соавт., 2025
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

S.A. Titova, I.F. Gette, M.O. Tonkushina, A.A. Ostroushko
“Immunomorphometric indices in rats after administration of polyoxometalates”, Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2025, Vol. 28, no. 3, pp. 481-486.
doi: 10.46235/1028-7221-17173-III

© Titova S.A. et al., 2025
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.46235/1028-7221-17173-III

ношении центральных органов иммунной системы: тимуса и костного мозга. Компенсация дефицита лейкоцитов в крови происходит преимущественно за счет лейкопоэза в селезенке.

Ключевые слова: тимус, селезенка, костный мозг, миелограмма, морфометрия, лейкоциты, полиоксометаллаты

IMMUNOMORPHOMETRIC INDICES IN RATS AFTER ADMINISTRATION OF POLYOXOMETALATES

Titova S.A.^a, Gette I.F.^b, Tonkushina M.O.^a, Ostroushko A.A.^a

^a B. Yeltsin Ural Federal University, Ekaterinburg, Russian Federation

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

Abstract. The impact of nanoparticles containing metal oxides may cause both increased proliferation and death of immunocompetent cells. Polyoxometalates (POMs) are nanoparticles containing iron (III) and molybdenum oxides. POMs are intended for targeted transport of drugs. Nanoparticles may produce effects that differ from those from a mixture of compounds within nanoparticles. The aim of the work is to investigate the effect of POMs and a mixture of POMs components (derivatives) on the morphometric parameters of the thymus, spleen, number of blood leukocytes and their precursors in bone marrow. The study was conducted in 25 mature male Wistar rats divided into 5 equal groups: animals in groups 1 and 2 were injected intramuscularly with POMs once and seven times, animals in groups 3 and 4 were injected with derivatives also once and seven times, the first group was left intact. A single dose of POMs or derivatives was 0.15 mg/100 g of body mass. We have evaluated cortical-medullary ratio in thymus and morphometric parameters of spleen (areas of stroma, white pulp, lymphoid follicles, and width of the mantle and marginal zones of lymphoid follicles). Based on the morphometric parameters, the quotients were calculated for the integral assessment of spleen morphometry: stromal-parenchymatous ratio (SPR), follicular coefficient (FC), and lymphoid coefficient (LC). The number of leukocytes and their fractions in peripheral blood, and the numbers of leukocyte precursors in bone marrow were determined. When comparing the parameters of rats treated with POMs and derivatives with appropriate indices of intact rats, the following results were obtained: we did not reveal any significant differences for the cortico-medullary ratios of thymus; increased SPR in group 3, like as of SPR, FC value, and the width of marginal zone in group 5. In groups 2-5, leukopenia was detected due to a deficiency of granulocytes. When derivatives were administered, the number of lymphocytes was also decreased in groups 4-5. Increased number of the bone marrow monocytic cells was detected in groups 3 and 5. Changes in peripheral immunopoietic organ, i.e., hyperplasia of spleen lymphatic tissues, was observed to more extent under the action of individual components of nanoparticles (derivatives) than after injection of POMs. The action of POMs and derivatives is less pronounced in central organs of the immune system, i.e., thymus and bone marrow. Compensation of the leukocyte deficiency in blood occurs, mainly, due to spleen leukopoiesis.

Keywords: thymus, spleen, bone marrow, myelogram, morphometry, leukocytes, polyoxometalates

Работа выполнена в рамках бюджетной темы ИИФ УрО РАН, № гос. регистрации 122020900136-4, а также в рамках государственного задания по науке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (проект № 123031300049-8).

Введение

Исследование действия наночастиц на органы иммунной системы необходимо для прогнозирования иммунорезистентности и воспалитель-

ной реакции организма. Влияние наночастиц на структуру и функции органов иммунной системы зависит от химической природы наночастиц, их размера, растворимости, способа и длительности экспозиции, что может быть причиной противоречивости результатов исследований, представленных в различных публикациях [2, 4, 5, 6, 7]. В ряде экспериментов показано, что введение наночастиц с оксидами меди и алюминия, сопровождается накоплением металлов в органах, подавлением пролиферации и апоптозом им-

мунокомпетентных клеток в тимусе, селезенке, лимфоузлах и в крови [2, 4]. В других исследованиях при введении наноматериалов, содержащих золото, оксиды железа, кадмия, выявлены усиление пролиферации и дифференцировки лимфоцитов в селезенке и тимусе, увеличение количества лейкоцитов и нейтрофилов в крови [5, 6, 7], что авторы расценивают как провоспалительное действие наночастиц.

Нанокластерный полиоксометаллат $\{\text{Mo}_{72}\text{Fe}_{30}\}$ (ПОМ) — соединение, молекулы которого представляют собой наноразмерную сферическую структуру, образованную кислородными полиэдрами молибдена и железа, и стабилизирующими лигандами. Химическая формула ПОМ: $[\text{Mo}_{72}\text{Fe}_{30}\text{O}_{252}(\text{CH}_3\text{COO})_{12}\{\text{Mo}_2\text{O}_7(\text{H}_2\text{O})\}_2\{\text{H}_2\text{Mo}_2\text{O}_8(\text{H}_2\text{O})\}(\text{H}_2\text{O})_{91}]\cdot 150\text{H}_2\text{O}$. ПОМ не проявляет выраженной токсичности, не накапливаются в печени, почках, головном мозге, но влияние ПОМ на органы иммунной системы исследовано недостаточно [3]. Действие соединений, организованных в наночастицы, может отличаться от действия смеси отдельных компонентов ПОМ.

Цель работы — исследовать влияние ПОМ и смеси компонентов ПОМ (дериватов) на морфометрические показатели тимуса, селезенки, количество лейкоцитов крови и их предшественников в костном мозге.

Материалы и методы

ПОМ изготовили в соответствии с методом M Iler et al. (1998), описанном в публикации [3]. Для инъекций использовали водный раствор ПОМ 1 мг/мл. Дериваты ПОМ получали посредством увеличения pH с последующей нейтрализацией раствора; конечная концентрация дериватов составляла 1 мг/мл. В эксперименте использовано 25 крыс-самцов Wistar возрастом 3 месяца и массой 250–350 г. Обращение с животными соответствовало Директиве Совета ЕС 2010/63/EU и Протоколу этического комитета ИИФ УрО РАН (№ D-PM-2015-27). Выделили группы животных по 5 крыс в группе: 1 — интактная; 2 — ПОМ 1 сутки; 3 — ПОМ 7 суток; 4 — дериваты 1 сутки; 5 — дериваты 7 суток. Раствор ПОМ или дериватов вводили внутримышечно однократно или семикратно из расчета 0,15 мг/100 г массы тела в однократной дозе. Животных выводили из эксперимента декапитацией под эфирным наркозом. Гематологические показатели определяли в крови из хвостовой вены на анализаторе Celly 70 Biocode Нусел. Мазок костного мозга из бедренной кости фиксировали по Май–Грюнвальду, окрашивали по Романовскому–Гимзе. Для фиксации тимуса и селезенки использовали 10% формалин, обезвоживание в батарее спиртов и заливку в

парафин, для изготовления срезов — микротом Leica SM 2000R (Leica Microsystems, Германия), окрашивание гематоксилином и эозином. Подсчет морфометрических показателей проводили при увеличении в 40 и 100 раз с использованием светового микроскопа Leica DM2500, камеры Leica DFC420 и программного пакета анализа изображений Leica Application Suite (Leica Microsystems, Германия). Определяли площадь коркового и мозгового вещества тимуса и рассчитывали корково-мозговой индекс (КМИ). В селезенке подсчитывали площадь стромы (СТ), белой пульпы (БП) и лимфоидных фолликулов (ЛФ), ширину периаартериальных лимфоидных муфт (ПАЛМ), площадь мантийной и маргинальной зон ЛФ. Рассчитывали стромально-паренхиматозное отношение (СПО), фолликулярный коэффициент (ФК) и лимфоидный коэффициент (ЛК) по формулам: $\text{СПО} = (\text{СТ}/\text{БП}) \times 100$, $\text{ФК} = (\text{БП} \times \text{ЛФ})/1000000000$, где делитель взят произвольно с целью получения удобных для восприятия числовых значений, $\text{ЛК} = \text{ЛФ}/\text{ПАЛМ}$ [1]. Данные представлены в виде среднее $\pm$ ошибка среднего. Для выявления достоверных отличий между группами использовали U-критерий Мана–Уитни, отличия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

При сравнении КМИ тимуса крыс, получавших ПОМ и дериваты наночастиц, не обнаружено достоверных отличий от КМИ интактных крыс (табл. 1), что указывает на отсутствие Т-клеточной активации.

При подсчете морфометрических показателей селезенки у крыс, получивших 7 инъекций ПОМ (группа 3), установлено только снижение коэффициента СПО относительно нормы (табл. 1). Семикратное введение дериватов (группа 5) сопровождалось увеличением площади белой пульпы и, соответственно, снижением СПО, более выраженным, чем у животных группы 3. Уменьшение коэффициента СПО связано с гиперплазией белой пульпы, подвергающейся действию ПОМ и их дериватов. Более интенсивное действие дериватов по сравнению с действием ПОМ подтверждается увеличением ФК в группе 5 относительно показателя интактных крыс и крыс группы 3, поскольку ФК отражает общий объем лимфатического аппарата селезенки [1]. У крыс, получавших ПОМ и дериваты, не обнаружено достоверных отличий от нормы показателя ЛК, соответствующего соотношению зон В-лимфоцитов и Т-лимфоцитов, а также изменения ширины мантийной зоны, где происходит кооперация Т- и В-лимфоцитов и накопление

ТАБЛИЦА 1. МОРФОМЕТРИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ ТИМУСА И СЕЛЕЗЕНКИ

TABLE 1. MORPHOMETRIC PARAMETERS OF THE THYMUS AND SPLEEN

Группы/Показатели Groups/Parameters	1 Интakтная Intact	2 ПОМ 1 сутки POMs 1 day	3 ПОМ 7 суток POMs 7 days	4 Дериваты 1 сутки Derivatives 1 day	5 Дериваты 7 суток Derivatives 7 days
КМИ TCI	5,24±0,66	3,93±0,53	7,50±1,94	3,81±0,80	6,38±1,25
БП, мм ² WP, mm ²	1,012±0,058	0,900±0,129	1,091±0,177	0,774±0,131	2,188±0,131* **
СПО SPR	539,7±33,0	640,4±97,8	393,4±43,1*	669,4±95,8	226,0±8,1* **
ФК FC	85,00±22,99	83,03±17,80	157,55±49,24	60,95±15,68	364,57±26,50* **
ЛК LC	1652,5±295,5	1696,2±204,2	2712,6±379,0	1083,6±184,5	1787,6±120,5
Мантийная зона ЛФ, μм × 10 ³ Mantle zone of LF, μm × 10 ³	44,42±2,62	35,63±6,12	64,20±14,43	41,47±5,83	50,43±7,02
Маргинальная зона ЛФ, μм × 10 ³ Marginal zone of LF, μm × 10 ³	42,08±25,80	59,81±18,85	71,37±23,77	37,64±13,21	111,34±4,25*

Примечание. КМИ – корково-мозговой индекс тимуса. Показатели в селезенке: БП – площадь белой пульпы; СПО – стромально-паренхиматозное отношение; ФК – фолликулярный коэффициент; ЛК – лимфоидный коэффициент; ЛФ – лимфоидный фолликул. ПОМ – полиоксометаллаты. * – $p < 0,05$ по сравнению с интактной группой; ** – $p < 0,05$ по сравнению с группой «дериваты» соответствующего срока.

Note. TCI, thymus cortex index. Splenic parameters: WP, white pulp area; SPR, stromal-parenchymatous ratio; FC, follicular coefficient; LC – lymphoid coefficient; LF, lymphoid follicle. POMs, polyoxometalates. *, $p < 0.05$ compared to the intact group; **, $p < 0.05$ compared to the derivative group of the corresponding period.

В-лимфоцитов памяти. В то же время при семикратном действии дериватов увеличилась относительно нормы ширина маргинальной зоны – область взаимодействия Т- и В-лимфоцитов и презентации антигенов макрофагами [1].

Изменения гематологических показателей после действия ПОМ и дериватов проявляются в виде дефицита общего количества лейкоцитов, особенно выраженного при семикратном действии дериватов (табл. 2). Недостаток лейкоцитов после введения ПОМ происходит за счет уменьшения фракции гранулоцитов, а после введения дериватов – за счет уменьшения лимфоцитарной и гранулоцитарной фракций. Дефицит гранулоцитов, вероятно, связан с активацией нетоза в ответ на введение чужеродного материала. Дериваты, помимо нетоза, могут, вероятно, также вызывать апоптоз лимфоцитов [3]. Гиперплазия лимфоидного аппарата селезенки, особенно выраженная в группе 5, может быть компенсатор-

ным ответом на уменьшение количества лимфоцитов в крови после введения дериватов.

При подсчете миелограммы установлено отсутствие достоверных изменений количества предшественников лимфоцитов, нейтрофилов и гранулоцитов относительно нормы у крыс, получавших ПОМ и дериваты (табл. 2). Количество клеток моноцитарного ряда в костном мозге животных после семи инъекций ПОМ и дериватов увеличилось, что, вероятно, позволило поддерживать в норме количество моноцитов в крови крыс в группах 3 и 5.

Выводы

1. Изменение в периферическом органе иммунопэза, а именно гиперплазия лимфатического аппарата селезенки, наблюдается в большей степени при действии отдельных компонентов наночастиц (дериватов), чем при действии ПОМ.

ТАБЛИЦА 2. ЛЕЙКОЦИТЫ В КРОВИ (ТЫС/МКЛ) И ПРЕДШЕСТВЕННИКИ ЛЕЙКОЦИТОВ В КОСТНОМ МОЗГЕ (МИЛЛИОН КЛЕТОК/100 Г МАССЫ ТЕЛА)

TABLE 2. LEUKOCYTES IN THE BLOOD (THOUSAND/ML) AND LEUKOCYTE PRECURSORS IN THE BONE MARROW (MILLION CELLS/100 G BODY WEIGHT)

Группы/Показатели Groups/Parameters	1 Интактная Intact	2 ПОМ 1 сутки POMs 1 day	3 ПОМ 7 суток POMs 7 days	4 Дериваты 1 сутки Derivatives 1 day	5 Дериваты 7 суток Derivatives 7 days
Лейкоциты в крови Leukocytes in the blood	10,65±0,80	6,21±0,53*	6,23±0,81*	4,70±0,42*	3,34±0,78* **
Лимфоциты в крови Lymphocytes in the blood	4,10±0,25	4,50±0,40	4,22±0,47	2,47±0,34* **	1,92±0,53* **
Моноциты в крови Monocytes in the blood	0,51±0,17	0,58±0,07	0,56±0,11	0,38±0,24	0,13±0,07
Гранулоциты в крови Granulocytes in blood	6,00±0,70	1,08±0,08*	1,48±0,40*	1,83±0,37*	1,27±0,23*
Лимфоидный ряд в КМ Lymphoid series in BM	102,9±3,9	93,0±9,7	115,2±9,5	103,6±9,0	111,5±14,1
Моноцитарный ряд в КМ Monocytic series in BM	11,9±1,1	14,6±1,5	22,1±2,7*	15,5±2,3	18,3±1,6*
Нейтрофильный ряд в КМ Neutrophilic series in BM	66,6±2,9	60,8±6,7	62,7±5,1	56,5±4,3	68,7±10,5
Гранулоциты в КМ Granulocytes in BM	73,0±3,0	65,8±7,2	71,1±4,9	62,9±5,1	74,8±11,9

Примечание. КМ – костный мозг; ПОМ – полиоксометаллаты. * – $p < 0,05$ по сравнению с интактной группой; ** – $p < 0,05$ по сравнению с группой «дериваты» соответствующего срока.

Note. BM, bone marrow; POMs, polyoxometalates. *, $p < 0.05$ compared to the intact group; **, $p < 0.05$ compared to the derivatives group of the corresponding period.

2. Действие ПОМ и дериватов в меньшей степени проявляется в отношении центральных органов иммунной системы: тимуса и костного мозга.

3. Компенсация дефицита лейкоцитов при введении ПОМ и их дериватов в крови происходит преимущественно за счет лейкопоэза в селезенке.

Список литературы / References

1. Волков В.П. Новый алгоритм морфометрической оценки функциональной иммуноморфологии селезенки // *Universum: медицина и фармакология*, 2015. № 5-6 (18). [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://7universum.com/ru/med/archive/item/2341>. [Volkov V.P. New algorithm of the morphometric assessment of functional immunomorphology of the spleen. *Universum: meditsina i farmakologiya* = *Universum: Medicine and Pharmacology*, 2015, no. 5-6 (18). [Electronic resource]. Available at: <http://7universum.com/ru/med/archive/item/2341>. (In Russ.)]
2. Шарафутдинова Л.А., Синельников К.Н., Валиуллин В.В. Токсическое влияние наночастиц диоксида титана на морфологические характеристики тимуса // *Казанский медицинский журнал*, 2018. Т. 99, № 6. С. 947-953. [Sharafutdinova L.A., Sinel'nikov K.N., Valiullin V.V. Toxic effect of titanium dioxide nanoparticles on morphological characteristics of thymus. *Kazanskiy meditsinskiy zhurnal* = *Kazan Medical Journal*, 2018, Vol. 99, no. 6, pp. 947-953. (In Russ.)]
3. Danilova I.G., Gette I.F., Medvedeva S.YU., Belousova A.V., Tonkushina M.O., Ostroushko A.A. Influence of iron-molybdenum Nanocluster polyoxometallates on the apoptosis of blood leukocytes and the level of heat-shock proteins in the cells of thymus and spleen in rats. *Nanotechnologies in Russia*, 2016, Vol. 11, no. 9-10, pp. 653-662.

4. Devanabanda M., Sana S.S, Madduri R., Kim S.C, Irvani S., Varma R.S, Vadde R. Immunomodulatory effects of copper nanoparticles against mitogen-stimulated rat splenic and thymic lymphocytes. *Food Chem. Toxicol.*, 2024, Vol. 184, 114420. doi: 10.1016/j.fct.2023.114420.
5. Li H., Huang T., Wang Y., Pan B., Zhang L., Zhang Q., Niu Q. Toxicity of alumina nanoparticles in the immune system of mice. *Nanomedicine (Lond.)*, 2020, Vol. 15, no. 9, pp. 927-946.
6. Park E.J., Oh S.Y, Kim Y., Yoon C., Lee B.S, Kim S.D, Kim J.S. Distribution and immunotoxicity by intravenous injection of iron nanoparticles in a murine model. *J. Appl. Toxicol.*, 2016, Vol. 36, no. 3, pp. 414-423.
7. Tulinska J., Masanova V., Liskova A., Mikusova M.L., Rollerova E, Krivosikova Z., Stefikova K., Uhnakova I., Ursinyova M., Babickova J., Babelova A., Busova M., Tothova L., Wsolova L., Dusinska M., Sojka M., Horvathova M., Alacova R., Vecera Z., Mikuska P., Coufalik P., Krumal K., Capka L., Docekal B. Six-week inhalation of CdO nanoparticles in mice: The effects on immune response, oxidative stress, antioxidative defense, fibrotic response, and bones. *Food Chem. Toxicol.*, 2020, Vol. 136, 110954. doi: 10.1016/j.fct.2019.110954.

Авторы:

Тимова С.А. — аспирант, младший научный сотрудник, НИИ ФПМ лаборатория функционального дизайна нанокластерных полиоксометаллатов, Институт естественных науки и математики ФГАОУ ВО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина», г. Екатеринбург, Россия

Гетте И.Ф. — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории морфологии и биохимии ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук, г. Екатеринбург, Россия

Тонкушина М.О. — к.х.н., старший научный сотрудник Научно-исследовательского института физики и прикладной математики, Институт естественных науки и математики ФГАОУ ВО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина», г. Екатеринбург, Россия

Остроушко А.А. — д.х.н., профессор, главный научный сотрудник, заведующий отделом Научно-исследовательского института физики и прикладной математики, Институт естественных науки и математики ФГАОУ ВО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина», г. Екатеринбург, Россия

Authors:

Titova S.A., Postgraduate Student, Junior Researcher, Laboratory of Nanocluster Polyoxometalates Functional Design, Research Institute of Research Institute of Physics and Applied mathematics, Institute of Natural Sciences and Mathematics, B. Yeltsin Ural Federal University, Ekaterinburg, Russian Federation

Gette I.F., PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratory of Morphology and Biochemistry, Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, Russian Federation

Tonkushina M.O., PhD (Chemistry), Senior Researcher, Research Institute of Physics and Applied Mathematics, Institute of Natural Sciences and Mathematics, B. Yeltsin Ural Federal University, Ekaterinburg, Russian Federation

Ostroushko A.A., PhD, MD (Chemistry), Professor, Chief Researcher, Head of the Department, Research Institute of Physics and Applied Mathematics, Institute of Natural Sciences and Mathematics, B. Yeltsin Ural Federal University, Ekaterinburg, Russian Federation

Поступила 29.03.2025
Отправлена на доработку 18.04.2025
Принята к печати 25.05.2025

Received 29.03.2025
Revision received 18.04.2025
Accepted 25.05.2025

ДЛИТЕЛЬНАЯ АКТИВАЦИЯ ТУЧНЫХ КЛЕТОК КАК ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МОДЕЛЬ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ИХ РОЛИ В РЕГУЛЯЦИИ СПЕРМАТОГЕНЕЗА

Садек Али^{1,2}, Печенкина М.А.¹, Храмова Ю.С.³

¹ ФГАОУ ВО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина»,
г. Екатеринбург, Россия

² ГАОУ СО «Центр специализированных видов медицинской помощи “Институт медицинских клеточных технологий”», г. Екатеринбург, Россия

³ ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук,
г. Екатеринбург, Россия

Резюме. Тучные клетки являются важным компонентом иммунного микроокружения органов мужской репродуктивной системы и участвуют в их регуляции в норме и при патологии. Моделирование дисрегуляции в виде активации или ингибирования тучных клеток и исследование влияния данного нарушения на сперматогенез может помочь в установлении точных механизмов регуляции данного процесса. Одним из активаторов тучных клеток является препарат Ципрофлоксацин, который зарекомендовал себя в исследованиях тучных клеток сердца, однако ранее не использовался в работах по изучению сперматогенеза. Цель данного исследования — оценить влияния разных схем приема препарата Ципрофлоксацин на тучные клетки репродуктивных органов самцов крыс и выбрать оптимальную дозу и продолжительность приема для создания модели, которая позволит исследовать участие тучных клеток в регуляции сперматогенеза. Эксперимент проведен на самцах линии Wistar. Использовали разные концентрации ципрофлоксацина (200 и 400 мг/кг) и сроки его приема. На гистологических препаратах оценивали морфофункциональные параметры тучных клеток семенников и придатков семенников. Препарат Ципрофлоксацин модулирует активность тучных клеток в зависимости от времени, дозы и ткани. После приема препарата в дозе 200 мг/кг 7 суток увеличивается количество, синтетическая активность тучных клеток и процент клеток со зрелыми гранулами как в семенниках, так и в придатках наряду с неизменной дегрануляцией, что указывает на прохождение «подготовительной» фазы, заключающейся в миграции тучных клеток в репродуктивные органы и накоплении ими секрета. После следует начало активной дегрануляции, которая сопровождается возвращением количества тучных клеток к показателю интактной группы, сохранением повышенной синтетической активности и преобладанием в семенниках клеток со зрелыми гранулами. Более

Адрес для переписки:

Садек Али
ФГАОУ ВО «Уральский федеральный университет
имени первого Президента России Б.Н. Ельцина»
620062, Россия, г. Екатеринбург, ул. Мира, 19.
Тел.: 8 (982) 654-80-27.
E-mail: sadek1996@mail.ru

Address for correspondence:

Sadek Ali
Ural Federal University named after
the First President of Russia B.N. Yeltsin
19 Mira St
Ekaterinburg
620062 Russian Federation
Phone: +7 (982) 654-80-27.
E-mail: sadek1996@mail.ru

Образец цитирования:

Али Садек, М.А. Печенкина, Ю.С. Храмова
«Длительная активация тучных клеток как
экспериментальная модель для исследования их
роли в регуляции сперматогенеза» // Российский
иммунологический журнал, 2025. Т. 28, № 3. С. 487-494.
doi: 10.46235/1028-7221-17180-LTA

© Садек Али и соавт., 2025
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

Ali Sadek, M.A. Pechenkina, Yu.S. Khramtsova
“Long-term activation of mast cells as an experimental model for studying
their role in the regulation of spermatogenesis”, Russian
Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii
Zhurnal, 2025, Vol. 28, no. 3, pp. 487-494.
doi: 10.46235/1028-7221-17180-LTA

© Sadek Ali et al., 2025
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.46235/1028-7221-17180-LTA

высокая доза ципрофлоксацина (400 мг/кг) ускоряет активацию тучных клеток, что приводит к более ранней дегрануляции. Количество и функциональные параметры тучных клеток под действием препарата изменяются аналогично в обоих исследуемых органах, однако наблюдаемые морфометрические изменения и показатели созревания гранул демонстрируют тканеспецифические адаптивные реакции. Проведенное исследование дает основание рекомендовать дозу 400 мг/кг в течение 7 дней для активации тучных клеток в репродуктивных органах самцов крыс и изучения сперматогенеза. Дозу 200 мг/кг следует использовать с целью предварительной стимуляции миграции тучных клеток, повышения их синтетической активности и созревания перед применением другого активатора — индуктора дегрануляции. Данная доза также будет предпочтительной для более длительных экспериментов, чтобы свести к минимуму потенциальные побочные эффекты, связанные с более высокой дозировкой.

Ключевые слова: тучные клетки, сперматогенез, дегрануляция, активация тучных клеток, ципрофлоксацин, семенник, придаток семенника

LONG-TERM ACTIVATION OF MAST CELLS AS AN EXPERIMENTAL MODEL FOR STUDYING THEIR ROLE IN THE REGULATION OF SPERMATOGENESIS

Sadek Ali^{a,b}, Pechenkina M.A.^a, Khramtsova Yu.S.^c

^a Ural Federal University named after the First President of Russia B.N. Yeltsin, Ekaterinburg, Russian Federation

^b Institute of Medical Cell Technologies of the Sverdlovsk Region, Ekaterinburg, Russian Federation

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

Abstract. Mast cells are an important component of the immune microenvironment in the male reproductive system, involved in both physiological regulation and pathological processes via secretion of various bioactive substances. Modeling dysregulation through activation or inhibition of mast cells, and studying the impact of this disturbance on spermatogenesis, may help identify the precise regulatory mechanisms by which these cells influence this process. Ciprofloxacin, an antibiotic known to activate mast cells, has shown efficiency in cardiac mast cell studies but has not been investigated in spermatogenesis. The aim of this study was to evaluate the effects of various ciprofloxacin regimens on mast cells in reproductive organs of male Wistar rats and to determine an optimal dose and duration for developing a model suitable for investigating mast cell involvement in spermatogenesis. Male Wistar rats were treated with ciprofloxacin at 200 and 400 mg/kg for different durations. Morphological and functional characteristics of mast cells in the testes and epididymides were assessed histologically. Ciprofloxacin was shown to modulate the mast cell activity in a time-, dose-, and tissue- dependent manner. At a dose of 200 mg/kg for 7 days, it caused an increase in mast cell numbers, enhanced synthetic activity, and raised the proportion of cells with mature granules in both organs, while degranulation remained unchanged. This indicates a “preparatory” phase involving mast cell migration to reproductive tissues and granule accumulation. This process was followed by active degranulation after 14 days, associated with return to baseline cell numbers, sustained high synthetic activity, and a predominance of mast cells with mature granules, especially in testes. A higher ciprofloxacin dose (400 mg/kg) promoted acceleration of mast cell activation, leading to earlier degranulation. While functional changes were consistent across both organs, morphometric parameters and granule maturation showed tissue-specific responses. Notably, testicular mast cells displayed minimal morphometric changes, possibly due to the immune-privileged nature of the testes. Based on these findings, a 400 mg/kg dose for 7 days is recommended to induce mast cell activation for spermatogenesis studies. A 200 mg/kg ciprofloxacin dose is more suitable for pre-stimulation prior to the use of a degranulation inducer and for long-term studies, in order to minimize possible side effects associated with higher doses.

Keywords: mast cells, spermatogenesis, degranulation, mast cell activation, ciprofloxacin, testis, testis appendage

The work was carried out partly within the framework of the IIF UB RAS themes No. 122020900136-4.

Introduction

Mast cells (MCs) are an important component of the testicular microenvironment. Under normal conditions, they play a significant role in maintaining immune privilege and homeostasis within the testicular microenvironment [3]. This role is largely attributed to the regulatory effects of MC mediators on vascular permeability and immunomodulation. However, when MC function is impaired, these effects may shift towards a detrimental influence on spermatogenesis. Such dysregulation can disrupt the balance of the entire testicular microenvironment, potentially leading to various pathologies [8]. Modeling MC dysregulation, either through activation or inhibition, and examining its impact on spermatogenesis can help elucidate the precise mechanisms governing this process. While immunological factors play a significant role in MC activation, other various factors, including radiation, pathogens, proteins, proteolytic enzymes, opioids, estrogens, androgens, and certain antibiotics, can also trigger their response. Conversely, MC activity can be suppressed by low doses of γ -ionizing radiation (< 0.1 Gy), antihistamines, and MC stabilizers such as ketotifen [2]. Among antibiotics, fluoroquinolones which are effective against Gram-positive and Gram-negative bacteria, can also influence MC activity [6]. McNeil and colleagues reported that ciprofloxacin – the most used fluoroquinolone – can activate MCs via the Mas-related G-protein coupled receptor-X2 (MRGPRX2) [7], a detailed mechanism demonstrated by Liu et al. [5]. While ciprofloxacin has been used experimentally in studies of cardiac MCs [4], it has not been previously employed in studies of spermatogenesis, where longer-term activation is required due to the extended duration of the spermatogenic cycle.

The aim of this study is to evaluate the effects of different Ciprofloxacin administration regimens on MCs in the reproductive organs of male rats and to determine the optimal dosage and duration for developing a model to study the role of MCs in the regulation of spermatogenesis.

Materials and methods

The experimental animals were sexually mature male Wistar rats, aged 4 months, with a body weight of 350 – 472 g ($n = 24$). During the experiment, the animals were housed under standard vivarium conditions with a 12-hour light/dark cycle, without a special diet and with free access to drinking water. The

study was approved by the Ethics Committee of the IIF UB RAS (No. 10-23, dated 09.10.2023).

All animals were divided into 4 groups: 1) a group of intact animals (INT), $n = 6$; 2) a group of animals receiving ciprofloxacin at a dose of 200 mg/kg/day for 7 days (C200D7), $n = 6$; 3) a group of animals receiving ciprofloxacin at a dose of 200 mg/kg/day for 14 days (C200D14), $n = 6$; 4) a group of animals receiving ciprofloxacin at a dose of 400 mg/kg/day for 7 days (C400D7), $n = 6$.

The animals were euthanized by ether overdose, and the testicles and epididymides were collected. Histological preparations were made and stained with toluidine blue to assess MC parameters, including their quantity and functional state. Additionally, alcian blue-safranin staining was used to evaluate the degree of MC granule maturity.

Preparation of drug suspension

A ciprofloxacin suspension was prepared by finely crushing two 250 mg ciprofloxacin tablets (Ozon, Russia) and dissolving them in 20 mL of water, resulting in a final concentration of 500 mg/20 mL. The required doses for each animal were calculated and administered via oral gavage. The suspension was thoroughly mixed before each administration to ensure uniform drug distribution.

Quantification of MCs density

Scans of prepared tissue sections were obtained using a Leica DM2500 light microscope (Leica, Germany) equipped with a Basler acA1920-40um camera (Basler, Germany) and the MultiMedia Catalog 2008-2020 software. The number of MCs was objectively quantified in all scans using QuPath 0.5.0 [1], and their density was calculated as the number of MCs per 1 mm² of tissue section.

Assessment of MCs synthetic activity

FIJI ImageJ 1.54f [9] was used to objectively assess MC synthetic activity. The software was calibrated using the Rodbard function to convert grayscale intensity values to optical density (OD). After calibration, all scans were converted to 8-bit grayscale. In each scan, the OD of 50 cells was measured; if fewer than 50 cells were present, all available cells were analyzed. A higher OD value indicates more intense MC synthetic activity.

Assessment of MCs functional activity

MCs were classified into four categories: inactive, weakly degranulating, moderately degranulating, and actively degranulating.

The degranulation index (DI) of MCs was calculated using the following formula:

$$DI = \frac{D}{D + I} \times 100\%,$$

where D – the number of MCs with clear signs of degranulation, I – the number of inactive MCs.

Assessment of MCs granule maturity

Using Alcian blue-safranin staining, MCs were classified into three groups:

– MCs with immature granules, stained blue due to the affinity of their components for Alcian blue alone (Alc+ granules);

– MCs with granules of intermediate maturity, stained purple due to the affinity of their components for both Alcian blue and safranin (Alc+ granules and Saf+ granules);

– MCs with mature granules, stained red due to the high content of heparin, a sulfated glycosaminoglycan with a strong affinity for safranin (Saf+ granules).

Evaluation of MCs morphometric parameters

Using FIJI ImageJ 1.54f, the area and perimeter of 50 cells were measured in each preparation. If fewer than 50 cells were present, all available cells were analyzed. The software was calibrated by capturing images of an objective micrometer with a known scale. The number of microns per pixel was determined by measuring the distance between marked divisions on the micrometer and inputting this value into the software to ensure accurate morphometric analysis.

Statistical analysis of the obtained data

All data were analyzed using GraphPad Prism 9.5.1. The Kruskal–Wallis test was used to compare the number of MCs, DI, and granule maturity between groups. Dunn's test for pairwise comparisons, with subsequent correction using the two-stage stepwise method of Benjamini, Krieger, and Yekutieli, was applied to accurately determine differences between independent groups.

One-way ANOVA was used to compare OD and morphometric parameters of MCs among three or more groups, followed by the Games–Howell post-hoc test to determine intergroup differences.

Differences were considered statistically significant at $p < 0.05$. Data in the tables are presented as $M \pm SE$, Me, and the 95% CI of the median.

Results and discussion

During the experiment, different dosages and administration durations of the drug were tested. Administration of ciprofloxacin at 200 mg/kg for 7 days led to an increase in the number of MCs in the testes and epididymides of rats, with most cells containing mature granules. An increase in their synthetic activity was observed, while functional activity remained unchanged (Table 1). These findings suggest that during the first week of administration, ciprofloxacin stimulates the migration of MCs to the reproductive organs, enhances their synthesis of bioactive substances, and promotes granule maturation. However, it does not affect MCs degranulation, which remains at the same level as intact animals.

After 14 days of ciprofloxacin administration at 200 mg/kg, the number of MCs in the testes and epididymides returns to normal. However, their synthetic activity remains elevated compared to MCs in intact animals. Unlike the first week, MCs

degranulation in both the testes and epididymides increases significantly compared to the intact group and the C200D7 group (Table 1).

Administration of ciprofloxacin at 400 mg/kg for 7 days produces a combined effect similar to that of 200 mg/kg administered for 7 and 14 days. The number of MCs in the testes and epididymides increases significantly, accompanied by an increase in both synthetic and functional activity compared to the intact group (Table 1). In the testes, a large number of cells with mature granules are observed, whereas in the epididymis, there is only a tendency toward an increase in their number.

When comparing MCs parameters in the testes and epididymides, it was found that the number and functional activity of MCs changed similarly in both reproductive organs. However, synthetic activity, which generally increased with drug administration, and the distribution of cells based on granule maturity exhibited significant organ specificity. In the testes, synthetic activity showed a dose-dependent increase. In contrast, in the epididymides, synthetic activity decreased after two weeks of drug administration or when a higher dose of ciprofloxacin was used. This may suggest that testicular MCs replenish their granules more rapidly than epididymal MCs following degranulation. Additionally, in the testes, granule maturation was activated regardless of dose or duration of administration, whereas in the epididymides, this effect was observed only in the C200D7 group.

Morphometric characteristics of testicular MCs indicate greater resistance to the effects of ciprofloxacin, as their area remains unchanged compared to the intact group. A small, but significant, increase in their perimeter was observed after the administration of 200 mg/kg ciprofloxacin for two weeks and 400 mg/kg for one week, compared to the C200D7 group but remained at the same level as in the intact group. In contrast, epididymal MCs demonstrate a significant decrease in both area and perimeter following ciprofloxacin administration, regardless of the dose or duration.

The choice of drug doses in this study is based on the intravenous ciprofloxacin concentration of 150 mg/kg, which has been used in studies of cardiac MCs [4], where stable activation of these cells was demonstrated. According to the Northern Health (Canada) clinical guideline “Intravenous to oral conversion for antimicrobials” the ciprofloxacin conversion factor is 1.25. Therefore, an oral dose of 200 mg/kg was used in this study to activate MCs. To study the effect of an increased dose, a 400 mg/kg dosage (double the initial dose) was administered.

The results of this study demonstrate that ciprofloxacin modulates MCs activity in a time-, dose-, and tissue-dependent manner (Figure 1). The increase in the number and synthetic activity

TABLE 1. THE EFFECT OF CIPROFLOXACIN ON MAST CELL PARAMETERS IN THE REPRODUCTIVE ORGANS OF MALE RATS

Группы Groups	Параметры / Parameters						ТК с разной степенью зрелости гранул, % Maturation degree of MCs granules, %		
	Количество ТК на 1 мм² среза, клеток/мм² MCs density, cells/mm²	Синтетическая активность, ОП Synthetic activity, OD	Индекс дегрануляции, % Degranulation Index, %	Площадь, мкм² Area, μm²	Периметр, мкм Perimeter, μm	Семенник / Testis	Незрелые Immature	Промежуточные Intermediate	Зрелые Mature
Придаток семенника / Epididymis									
ИНТ INT	2.45±0.37 2.04 (1.85-3.82)	0.389±0.004 0.390 (0.380-0.410)	54.95±5.59 55.56 (40.98-70.97)	64.05±2.29 56.00 (50.00-59.00)	31.67±0.52 30.50 (28.95-31.65)	33.11±6.53 30.23 (13.38-57.89)	14.47±2.70 12.15 (6.15-23.94)	52.42±5.63 46.51 (33.33-73.85)	
Ц200D7 C200D7	9.28±0.89 ^a 8.96 (6.89-12.64)	0.534±0.004 ^d 0.540 (0.530-0.550)	37.05±2.19 37.72 (27.47-43.08)	51.93±1.26 ^d 49.00 (46.00-51.00)	28.43±0.34 ^d 27.80 (26.97-28.72)	14.06±3.19 11.58 (6.14-27.47)	4.87±1.23 ^a 4.95 (0.00-8.42)	81.08±3.66 ^a 80.53 (67.03-91.11)	
Ц200D14 C200D14	4.11±0.59 ^b 3.82 (2.72-6.31)	0.499±0.004 ^{d, e} 0.510 (0.500-0.520)	71.92±2.61 ^b 72.08 (62.00-80.49)	55.89±1.41 ^d 51.50 (48.00-56.00)	29.60±0.36 ^d 29.23 (28.02-30.10)	22.71±4.62 23.49 (8.72-34.52)	7.95±1.52 7.98 (2.68-13.75)	69.33±5.77 70.89 (52.50-83.89)	
Ц400D7 C400D7	6.21±1.50 ^a 5.18 (2.63-11.94)	0.492±0.005 ^{d, e} 0.490 (0.480-0.500)	77.43±3.15 ^{a, b} 75.01 (70.18-91.18)	55.69±1.48 ^d 51.00 (47.00-55.00)	29.66±0.38 ^d 29.13 (28.16-29.95)	18.64±4.15 16.30 (7.32-35.62)	6.23±1.00 ^a 6.78 (2.44-8.85)	75.14±4.80 78.48 (56.85-90.24)	

Note. ^a, differences are statistically significant compared to the corresponding parameter of the intact group according to the Kruskal-Wallis test, followed by Dunn's post-hoc test, with correction using the Benjamini, Krieger and Yekutieli method ($q < 0.05$). ^b, differences are statistically significant compared to the corresponding parameter of C200D7 group according to the Kruskal-Wallis test, followed by Dunn's post-hoc test, with correction using the Benjamini, Krieger and Yekutieli method ($q < 0.05$). ^c, differences are statistically significant compared to the corresponding parameter of C200D14 group according to the Kruskal-Wallis test, followed by Dunn's post-hoc test, with correction using the Benjamini, Krieger and Yekutieli method ($q < 0.05$). ^d, differences are statistically significant compared to the corresponding parameter of the intact group according to one-way ANOVA with post-hoc test for multiple comparisons using the Games-Howell criterion ($p < 0.05$). ^e, differences are statistically significant compared to the corresponding parameter of C200D7 group according to one-way ANOVA with post-hoc test for multiple comparisons using the Games-Howell criterion ($p < 0.05$). ^f, differences are statistically significant compared to the corresponding parameter of C200D14 group according to one-way ANOVA with post-hoc test for multiple comparisons using the Games-Howell criterion ($p < 0.05$).

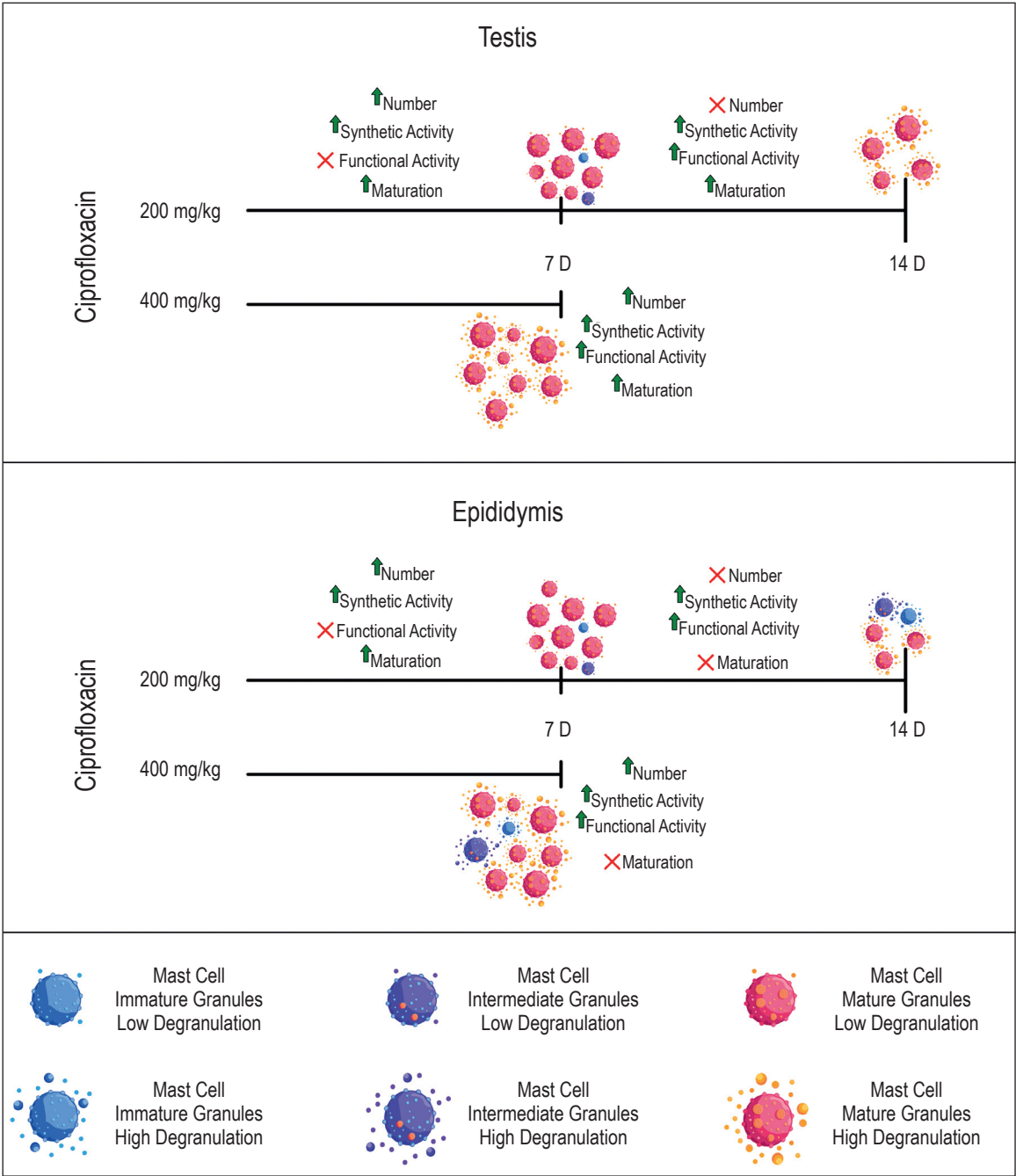


Figure 1. Effects of ciprofloxacin on mast cells with different intake regimens

of MCs, as well as the activation of their maturation in both the testes and epididymides, observed after administration of the drug at a dose of 200 mg/kg for 7 days, along with unchanged degranulation, suggests the transition through a “preparatory” phase of MCs, characterized by the migration of MCs into the reproductive organs and the accumulation of their secretion. This phase ends in the second week and is marked by the onset of active degranulation and the

return of the MCs count to levels seen in the intact group, while synthetic activity remains elevated. Regulatory mechanisms may be involved, initially suppressing MCs degranulation, but eventually being eliminated due to prolonged drug-induced activation. A higher dose of ciprofloxacin (400 mg/kg) accelerates MCs activation, resulting in earlier degranulation. This suggests that MCs response is influenced not only by time but also by dose.

While MCs parameters (quantity, synthetic and functional activity) change similarly in the testes and epididymides, the observed morphometric changes – specifically, the reduction in the size and altered shape of epididymal MCs – demonstrate tissue-specific adaptive responses. The absence of significant changes in the morphometric parameters of testicular MCs may be attributed to the unique immune-privileged microenvironment of the testes.

The conducted study provides grounds for recommending a dose of 400 mg/kg for 7 days to activate MCs in the reproductive organs of male rats and to study spermatogenesis. A dose of 200 mg/kg may be more suitable if the goal is to “prepare” MCs in the reproductive organs by stimulating their

migration, synthetic activity, and maturation before applying another activator to induce degranulation. Additionally, this lower dose may be preferable for longer experiments to minimize potential side effects associated with higher dosages.

Acknowledgments

This work was performed using the equipment of the Shared Research Center of Scientific Equipment SRC IIP UB RAS.

We thank the developers of Inkscape for providing great and completely free open-source software for creating illustrations. Inkscape Project. (2020). Available at: <https://inkscape.org> (accessed on 20 March 2025).

References

1. Bankhead P., Loughrey M.B., Fernández J.A., Dombrowski Y., McArt D.G., Dunne P.D., McQuaid S., Gray R.T., Murray L.J., Coleman H.G. QuPath: Open source software for digital pathology image analysis. *Sci. Rep.*, 2017, Vol. 7, no. 1, 16878. doi: 10.1038/s41598-017-17204-5
2. Baran J., Sobiepanek A., Mazurkiewicz-Pisarek A., Rogalska M., Gryciuk A., Kuryk L., Abraham S.N., Staniszevska M. Mast cells as a target – A comprehensive review of recent therapeutic approaches. *Cells*, 2023, Vol. 12, no. 8, 1187. doi: 10.3390/cells12081187.
3. Himelreich-Perić M., Katušić-Bojanac A., Hohšteter M., Sinčić N., Mužić-Radović V., Ježek D. Mast cells in the mammalian testis and epididymis – Animal models and detection methods. *Int. J. Mol. Sci.*, 2022, Vol. 23, no. 5, 2547. doi: 10.3390/ijms23052547.
4. Kuzmin V., Voronina Y., Abramov A., Karkhov A., Fedorov A. Prolonged stimulation of resident mast cells suppresses the automaticity of the sinus node of the heart via histamine H1 receptors. *Receptors and Intracellular Signaling*, 2023, pp. 404-408. (In Russ.)
5. Liu R., Hu S., Zhang Y., Che D., Cao J., Wang J., Zhao T., Jia Q., Wang N., Zhang T. Mast cell-mediated hypersensitivity to fluoroquinolone is MRGPRX2 dependent. *Int. Immunopharmacol.*, 2019, Vol. 70, pp. 417-427.
6. McNeil B.D. MRGPRX2 and adverse drug reactions. *Front. Immunol.*, 2021, Vol. 12, 676354. doi: 10.3389/fimmu.2021.676354.
7. McNeil B.D., Pundir P., Meeker S., Han L., Undem B.J., Kulka M., Dong X. Identification of a mast-cell-specific receptor crucial for pseudo-allergic drug reactions. *Nature*, 2015, Vol. 519, no. 7542, pp. 237-241.
8. Sadek A., Khramtsova Y., Yushkov B. Mast cells as a component of spermatogonial stem cells' microenvironment. *Int. J. Mol. Sci.*, 2024, Vol. 25, no. 23, 13177. doi: 10.3390/ijms252313177.
9. Schindelin J., Arganda-Carreras I., Frise E., Kaynig V., Longair M., Pietzsch T., Preibisch S., Rueden C., Saalfeld S., Schmid B. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods*, 2012, Vol. 9, no. 7, pp. 676-682.

Авторы:

Садек Али — аспирант, инженер-исследователь департамента биологии и фундаментальной медицины ФГАОУ ВО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина»; научный сотрудник центральной экспериментальной лаборатории биотехнологий ГАОУ СО «Центр специализированных видов медицинской помощи “Институт медицинских клеточных технологий”», г. Екатеринбург, Россия

Authors:

Sadek Ali, Postgraduate Student, Research Engineer, Department of Biology and Fundamental Medicine, Ural Federal University named after the First President of Russia B.N. Yeltsin; Researcher, Central Experimental Laboratory of Biotechnologies, Institute of Medical Cell Technologies of the Sverdlovsk Region, Ekaterinburg, Russian Federation

Печенкина М.А. — студент департамента биологии и фундаментальной медицины ФГАОУ ВО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина», г. Екатеринбург, Россия

Храмцова Ю.С. — к.б.н., доцент, старший научный сотрудник лаборатории иммунофизиологии и иммунофармакологии ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук, г. Екатеринбург, Россия

Pechenkina M.A., Student, Department of Biology and Fundamental Medicine, Ural Federal University named after the First President of Russia B.N. Yeltsin, Ekaterinburg, Russian Federation

Khramtsova Yu.S., PhD (Biology), Associate Professor, Senior Researcher, Laboratory of Immunophysiology and Immunopharmacology, Institute of Immunology and Physiology of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, Russian Federation

Поступила 29.03.2025

Отправлена на доработку 18.04.2025

Принята к печати 25.05.2025

Received 29.03.2025

Revision received 18.04.2025

Accepted 25.05.2025

ИММУННЫЕ КЛЕТКИ ПРИ ОСТРОМ ОТРАВЛЕНИИ АЦЕТАМИНОФЕНОМ В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МОДЕЛИ

Зудова А.И.^{1, 2}, Зильбер К.Ю.², Мишури́н Я.В.², Апанович С.В.³,
Соломатина Л.В.¹

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

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

³ ФГАОУ ВО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина»,
г. Екатеринбург, Россия

Резюме. Ацетаминофен (парацетамол) — одно из наиболее распространенных анальгезирующих и антипиретических средств, из-за чего часто возникают передозировки данным препаратом, связанные с острой гепатотоксичностью и последующим развитием системного воспаления, ухудшающим прогноз для пациента. При этом системное воспаление характеризуется системной активацией иммунной системы. Однако, по данным литературы, еще недостаточно изучен вклад разных типов иммунных клеток в патогенез отравления ацетаминофеном, что и определило цель данной работы. Цель работы — оценить изменения количества клеток, экспрессирующих CD3⁺, CD20⁺, CD45⁺ в тканях органов мышей линии C57Bl/6 при остром отравлении ацетаминофеном. Исследование было выполнено на половозрелых мышках-самцах линии C57Bl/6. Возраст животных на момент начала эксперимента составлял 10 недель. Мыши были разделены на 2 группы по 7 мышей в каждой. В экспериментальную группу входили животные, которым вводили раствор ацетаминофена (Sigma-Aldrich, США) в дозе 600 мг/кг в концентрации 14 мг/мл. Контрольной группе вводили эквивалентный объем физиологического раствора. Животных выводили из эксперимента через 24 часа, проводя изъятие внутренних органов (печени, почек, поджелудочной железы, легких, сердца). Для проведения иммуногистохимического исследования на CD3⁺, CD20⁺, CD45⁺ были использованы первичные кроличьи антитела компаний Sigma-Aldrich (США, C7930), Thermo Fisher Scientific (США, PA5-16701), Abcam (Великобритания, ab281586) с разведением дилуэнт (Leica Microsystems, Германия). Вторичные антитела были взяты компании Thermo Fisher Scientific

Адрес для переписки:

Зудова Алевтина Игоревна
ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии»
Уральского отделения Российской академии наук
620078, Россия, г. Екатеринбург,
ул. Первомайская, 106.
Тел.: 8 (343) 374-00-70.
E-mail: tina.zudova@mail.ru

Address for correspondence:

Alevtina I. Zudova
Institute of Immunology and Physiology,
Ural Branch, Russian Academy of Sciences
106 Pervomayskaya St
Ekaterinburg
620078 Russian Federation
Phone: +7 (343) 374-00-70.
E-mail: tina.zudova@mail.ru

Образец цитирования:

А.И. Зудова, К.Ю. Зильбер, Я.В. Мишури́н,
С.В. Апанович, Л.В. Соломатина «Иммунные
клетки при остром отравлении ацетаминофеном
в экспериментальной модели» // Российский
иммунологический журнал, 2025. Т. 28, № 3. С. 495–500.
doi: 10.46235/1028-7221-17181-ICI

© Зудова А.И. и соавт., 2025

Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

A.I. Zudova, K.Yu. Zilber, Ya.V. Mishurin, S.V. Apanovich,
L.V. Solomatina “Immune cells in experimental model
of acute poisoning with acetaminophen”, Russian Journal
of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2025,
Vol. 28, no. 3, pp. 495–500.
doi: 10.46235/1028-7221-17181-ICI

© Zudova A.I. et al., 2025

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

DOI: 10.46235/1028-7221-17181-ICI

(США, 31820). Анализ окрашенных срезов проводили на световом микроскопе Leica DM2500 (Leica Microsystems, Германия) с видеокамерой Leica DFC420 (Leica Microsystems, Германия). Статистический анализ данных осуществляли с применением программного обеспечения Statistica v.10 (Statsoft, США). При оценке содержания CD20⁺ клеток в тканях органов мышей C57Bl/6 наблюдали единичные клетки в поле зрения. Статистически значимых различий при этом по U-критерию Манна–Уитни выявлено не было, что говорит об отсутствии вклада В-лимфоцитов в патогенез отравления ацетаминофеном в первые 24 часа. Было определено статистически значимое снижение количества CD3⁺ клеток в ткани сердца. Через 24 часа после введения токсиканта отмечается увеличение количества CD45⁺ экспрессирующих иммунных клеток в печени, преимущественно за счет сегментоядерных нейтрофилов. Таким образом, в первые сутки после острого отравления ацетаминофеном у экспериментальных животных не отмечается значимого изменения CD3⁺ и CD20⁺ экспрессирующих клеток в тканях. При этом происходит увеличение содержания иммунных клеток к ткани печени, преимущественно за счет нейтрофилов.

Ключевые слова: ацетаминофен, парацетамол, отравление, иммунные клетки, иммунология, лимфоциты

IMMUNE CELLS IN EXPERIMENTAL MODEL OF ACUTE POISONING WITH ACETAMINOPHEN

Zudova A.I.^{a,b}, Zilber K.Yu.^b, Mishurin Ya.V.^b, Apanovich S.V.^c, Solomatina L.V.^a

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

^b Ural State Medical University, Ekaterinburg, Russian Federation

^c B. Yeltsin Ural Federal University, Ekaterinburg, Russian Federation

Abstract. Acetaminophen (paracetamol) is one of the most common analgesic and antipyretic agents. Therefore, the overdose with this drug are often observed, being associated with acute hepatotoxicity and systemic inflammation, worsening the clinical prognosis. In this case, systemic inflammation is characterised by systemic activation of immune system. However, the contribution of different types of immune cells to pathogenesis of acetaminophen poisoning has not been sufficiently studied thus determining the purpose of this work. The aim of this study was to evaluate changes in the number of cells expressing CD3⁺, CD20⁺, CD45⁺ in organs of C57Bl/6 mice during acute acetaminophen poisoning. The study was performed with sexually mature male C57Bl/6 mice. The mice were divided into 2 groups of 7 mice in each group. The experimental group included animals treated with acetaminophen solution (Sigma-Aldrich, USA) at a dose of 600 mg/kg at (14 mg/mL). An equivalent volume of physiological solution was administered to the control group. The animals were taken out of the experiment after 24 hours, and internal organs were removed. Primary rabbit antibodies from Sigma-Aldrich (C7930), Thermo Fisher Scientific (PA5-16701), Abcam (ab281586) were used for immunohistochemical study for CD3⁺, CD20⁺, CD45⁺ cells. Secondary antibodies were purchased from Thermo Fisher Scientific (31820). When assessing the content of CD20⁺ cells in organ tissues of C57Bl/6 mice, only single cells were observed in the field of view. Statistically significant differences were not revealed by Mann–Whitney U test thus suggesting absence of B cell contribution to the pathogenesis of acetaminophen poisoning in the first 24 hours. A statistically significant decrease in the number of CD3⁺ cells in heart tissue was determined. 24 hours after the toxicant administration, an increased number of CD45⁺ expressing immune cells was noted in liver, mainly, as segmented neutrophils. Hence, we did not found any significant changes in cell numbers of CD3⁺ and CD20⁺ expressing cells in the studied tissues by 24 hours after acute acetaminophen poisoning in experimental animals. At the same time, there is an increased content of immune cells in the liver tissue, mainly due to neutrophils.

Keywords: acetaminophen, paracetamol, poisoning, immune cells, immunology, lymphocytes

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ № 24-25-00469 «Роль системного воспаления в патогенезе отравления ацетаминофеном (N-ацетил-пара-аминофенолом)» и с использованием оборудования ЦКП Института иммунологии и физиологии УрО РАН.

Введение

Ацетаминофен (парацетамол) — одно из наиболее распространенных анальгезирующих и антипиретических средств, который входит в состав более 200 лекарственных препаратов, отпускаемых без рецепта [2]. Из-за такого обширного использования часто возникают передозировки данным препаратом, связанные с острой гепатотоксичностью и последующим развитием системного воспаления, ухудшающим прогноз для пациента.

Системное воспаление — это патологический процесс, развивающийся при системном повреждении и характеризующийся тотальной воспалительной реактивностью эндотелиоцитов, плазменных и клеточных факторов крови, соединительной ткани, а на заключительных этапах и микроциркуляторными расстройствами в жизненно важных органах и тканях [5]. При этом системное воспаление характеризуется системной активацией иммунной системы. Однако по данным литературы еще недостаточно изучен вклад разных типов иммунных клеток в патогенез отравления ацетаминофеном, что и определило цель данной работы.

Цель исследования — оценить изменения количества клеток, экспрессирующих CD3⁺, CD20⁺, CD45⁺ в тканях органов мышей линии C57Bl/6 при остром отравлении ацетаминофеном.

Материалы и методы

Исследование было выполнено на половозрелых мышах-самцах линии C57Bl/6. Возраст животных на момент начала эксперимента составлял 10 недель. Все манипуляции с животными были произведены в виварии Института иммунологии и физиологии Уральского отделения Российской академии наук (ИИФ УрО РАН). Организация исследования была одобрена этическим комитетом ФГБУН ИИФ УрО РАН, протокол № 04/22 от 18 ноября 2022 г.

Мыши были разделены на 2 группы по 7 мышей в каждой. В экспериментальную группу входили животные, которым вводили раствор ацетаминофена (Sigma-Aldrich, США) в дозе 600 мг/кг

в концентрации 14 мг/мл. Выбор дозировки препарата был обусловлен ранее проведенными исследованиями [1]. Контрольной группе вводили эквивалентный объем физиологического раствора.

Животных выводили из эксперимента через 24 часа с изофлурановым наркозом (Laboratories Karizoo, Испания), проводя изъятие внутренних органов (печени, почек, поджелудочной железы, легких, сердца). Далее производили фиксацию органов в 10% нейтральном формалине с дальнейшей стандартной гистологической проводкой в автоматизированном тканевом процессоре Leica TP 1020 (Leica Microsystems, Германия). После чего проводили заливку кусочков органов в парафин и изготавливали гистологические срезы толщиной 2–3 мкм.

Для проведения иммуногистохимического исследования на CD3⁺, CD20⁺, CD45⁺ были использованы первичные кроличьи антитела компаний Sigma-Aldrich (США, C7930), Thermo Fisher Scientific (США, PA5-16701), Abcam (Великобритания, ab281586) с разведением дилуэнтном (Leica Microsystems, Германия) в соотношении 1:500, 1:100, 1:2000 соответственно. Вторичные антитела были взяты компании Thermo Fisher Scientific (США, 31820) в разведении 1:1000.

Анализ окрашенных срезов проводили на световом микроскопе Leica DM2500 (Leica Microsystems, Германия) с видеокамерой Leica DFC420 (Leica Microsystems, Германия). Статистический анализ данных осуществляли с применением программного обеспечения Statistica v. 10 (Statsoft, США).

Результаты и обсуждение

При оценке содержания CD20⁺ клеток в тканях органов мышей C57Bl/6 наблюдали единичные клетки в поле зрения. Статистически значимых различий при этом по U-критерию Манна–Уитни выявлено не было, что говорит об отсутствии вклада В-лимфоцитов в патогенез отравления ацетаминофеном в первые 24 часа.

Было определено статистически значимое снижение количества CD3⁺ клеток в ткани сердца (табл. 1). При этом не отмечается изменения количества CD3⁺ клеток в ткани печени, как отмечено у О. Krenkel и соавт. [4].

Через 24 часа после острого отравления ацетаминофеном у экспериментальных животных отмечается увеличение количества CD45⁺ экспрессирующих иммунных клеток в печени (табл. 2), преимущественно за счет сегментоядерных нейтрофилов. Эти данные соотносятся с тем, что

ТАБЛИЦА 1. СОДЕРЖАНИЕ CD3⁺ КЛЕТОК В ТКАНЯХ ОРГАНОВ МЫШЕЙ ЛИНИИ C57Bl/6 ПРИ ОТРАВЛЕНИИ АЦЕТАМИНОФЕНОМ, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 1. THE CONTENT OF CD3⁺ CELLS IN THE TISSUES OF THE ORGANS OF THE MICE OF THE LINE C57Bl/6 WITH ACETAMINOPHEN POISONING, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

Органы Organs	Группы (№) Groups (No.)	Контрольная (№ 1) Control (No. 1) n = 7	Экспериментальная (№ 2) Experimental (No. 2) n = 7
Печень Liver		0,01 (0,00-0,09)	0,00 (0,00-0,00)
Почки Kidney		0,01 (0,01-0,02)	0,00 (0,00-0,02)
Легкие Lung		0,31 (0,03-0,39)	0,06 (0,00-0,10)
Поджелудочная железа Pancreas		0,01 (0,01-0,04)	0,00 (0,00-0,01)
Сердце Heart		0,03 (0,01-0,04)**	0,01 (0,00-0,01)*

Примечание. Содержание клеток рассчитано на 10 000 мкм² поля зрения. * – статистически значимые отличия (U-критерий Манна–Уитни, p < 0,05) от группы № 1, ** – статистически значимые отличия (U-критерий Манна–Уитни, p < 0,05) от группы № 2.

Note. The content of cells for 10,000 μm² fields of view is designed. *, statistically significant differences (Mann–Whitney U test, p < 0.05) with group No. 1; **, statistically significant differences (Mann–Whitney U test, p < 0.05) with group No. 2.

ТАБЛИЦА 2. СОДЕРЖАНИЕ CD45⁺ КЛЕТОК В ТКАНЯХ ОРГАНОВ МЫШЕЙ ЛИНИИ C57Bl/6 ПРИ ОТРАВЛЕНИИ АЦЕТАМИНОФЕНОМ, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 2. THE CONTENT OF CD45⁺ CELLS IN THE TISSUES OF THE ORGANS OF THE MICE OF THE LINE C57Bl/6 WITH ACETAMINOPHEN POISONING, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

Органы Organs	Группы (№) Groups (No.)	Контрольная (№ 1) Control (No. 1) n = 7	Экспериментальная (№ 2) Experimental (No. 2) n = 7
Печень Liver		0,002 (0,001-0,004)**	0,007 (0,005-0,024)*
Почки Kidney		0,001 (0,000-0,001)	0,001 (0,001-0,001)
Легкие Lung		0,013 (0,006-0,026)	0,022 (0,015-0,024)
Поджелудочная железа Pancreas		0,000 (0,000-0,000)	0,00 (0,00-0,00)
Сердце Heart		0,000 (0,000-0,000)	0,000 (0,000-0,001)

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. As for Table 1.

нейтрофилы мигрируют в печень к очагам повреждения ткани [4].

При этом можно отметить, что в легких, почках, поджелудочной железе, сердце не отмечается значимых различий по составу иммунных клеток.

Это может быть связано с тем, что 24 часа после введения токсиканта — это переход от стадии раннего восстановления к фазе регенерации после отравления [3], то есть запускаются процессы, связанные с разрешением областей повреждения.

Выводы

Таким образом, в первые сутки после острого отравления ацетаминофеном у экспериментальных животных не отмечается значимого изме-

нения CD3⁺ и CD20⁺ экспрессирующих клеток в тканях. При этом происходит увеличение содержания иммунных клеток в ткани печени, преимущественно за счет нейтрофилов.

Список литературы / References

1. Зудова А.И., Мухлынина Е.А., Соломатина Л.В. Экспериментальная модель системного воспаления при токсическом воздействии ацетаминофена // Российский иммунологический журнал, 2024. Т. 27, № 3. С. 421-426. [Zudova A.I., Mukhlynina E.A., Solomatina L.V. Experimental model of systemic inflammation during acetaminophen toxicity. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2024, Vol. 27, no. 3, pp. 421-426. (In Russ.)] doi: 10.46235/1028-7221-16654-ЕМО.
2. Сенцов В.Г., Гусев К.Ю., Давыдова Н.С., Чекмарёв А.В. Отравления парацетамолом: эпидемиология, диагностика, лечение (состояние вопроса) // Уральский медицинский журнал, 2024. Т. 23, № 6. С. 108-131. [Sentsov V.G., Gusev K.Y., Davydova N.S., Chekmarev A.V. Paracetamol Poisoning: Epidemiology, Diagnosis, Treatment (Status of the Issue). *Uralskiy meditsinskiy zhurnal = Ural Medical Journal*, 2024, Vol. 23, no. 6, pp. 108-131. (In Russ.)]
3. Jaeschke H., Adelusi O.B., Akakpo J.Y., Nguyen N.T., Sanchez-Guerrero G., Umbaugh D.S., Ding W.X., Ramachandran A. Recommendations for the use of the acetaminophen hepatotoxicity model for mechanistic studies and how to avoid common pitfalls. *Acta Pharm. Sin. B*, 2021, Vol. 11, no. 12, pp. 3740-3755.
4. Krenkel O., Mossanen J.C., Tacke F. Immune mechanisms in acetaminophen-induced acute liver failure. *Hepatobiliary Surg. Nutr.*, 2014, Vol. 3, no. 6, pp. 331-343.
5. 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:

Зудова А.И. — младший научный сотрудник лаборатории иммунологии воспаления ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук; ассистент кафедры нормальной физиологии ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Екатеринбург, Россия

Зильбер К.Ю. — студент ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Екатеринбург, Россия

Authors:

Zudova A.I., Junior Researcher, Laboratory of Inflammation Immunology, Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences; Assistant Professor, Department of Normal Physiology, Ural State Medical University, Ekaterinburg, Russian Federation

Zilber K. Yu., Student, Ural State Medical University, Ekaterinburg, Russian Federation

Мишури́н Я.В. — студент ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Екатеринбург, Россия

Mishurin Ya.V., Student, Ural State Medical University, Ekaterinburg, Russian Federation

Апанович С.В. — студент ФГАОУ ВО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина», г. Екатеринбург, Россия

Apanovich S.V., Student, B. Yeltsin Ural Federal University, Ekaterinburg, Russian Federation

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

Solomatina L.V., PhD (Medicine), Senior Researcher, Laboratory of Inflammation Immunology, Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, Russian Federation

Поступила 29.03.2025

Отправлена на доработку 17.04.2025

Принята к печати 25.05.2025

Received 29.03.2025

Revision received 17.04.2025

Accepted 25.05.2025

СВЕРХЭКСПРЕССИЯ PPM1D ПРИВОДИТ К ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНОМУ ЦИТОКИНОВОМУ ПРОФИЛЮ В ОТВЕТ НА АКТИВАЦИЮ NF-κB В КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ КОЛОРЕКТАЛЬНОГО РАКА ЧЕЛОВЕКА

Колосова Е.Д.^{1,2}, Лисица Д.А.¹, Демидов О.Н.^{1,2}, Богданова Д.А.^{1,2}

¹ АНОО ВО «Научно-технологический университет «Сириус», пгт Сириус, Краснодарский край, Россия

² ФГБУН «Институт цитологии» Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Протеинфосфатаза PPM1D (Protein phosphatase, Mg²⁺/Mn²⁺ dependent, 1D) является одним из ключевых регуляторов реакции на стресс, вызванной повреждением ДНК, клеточного цикла и апоптоза. Сверхэкспрессию PPM1D обнаруживают в большом количестве типов как солидных (рак легких, рак молочной железы и т.д.), так и гематологических (острый миелоидный лейкоз) злокачественных новообразований, что делает PPM1D важным прогностическим маркером при онкологиях. Особое внимание стоит уделить сверхэкспрессии PPM1D в колоректальном раке (КРР), являющемся третьим по распространенности среди всех онкологических заболеваний, потому что данный показатель коррелирует с увеличением размера опухоли, метастазированием, неблагоприятным прогнозом выживаемости и развитием лекарственной устойчивости. При этом лекарственная резистентность может быть связана с тем, что PPM1D напрямую дефосфорилирует p53 и другие компоненты сигнального пути ATM-p53, а также выступает в роли негативного регулятора NF-κB. Вероятно, что сверхэкспрессия PPM1D в опухолевых клетках КРР может приводить к снижению синтеза важных провоспалительных цитокинов и развитию иммуносупрессивного окружения опухоли, что может значительно ухудшать исход терапии. На данный момент роль PPM1D в регуляции воспалительного ответа в КРР остается недостаточно изученной. Целью данного исследования является сравнение эффекта химического ингибирования PPM1D путем использования его селективного ингибитора GSK2830371 и генетического нокаута PPM1D на линии КРР человека HT-29 в условиях индукции сигнального пути NF-κB при обработке TNF. В данной работе была использована клеточная линия КРР человека HT-29, а также ранее полученные линии HT-29 с нокаутом и с повышенной экспрес-

Адрес для переписки:

Колосова Екатерина Дмитриевна
АНОО ВО «Научно-технологический университет
«Сириус»
354349, Россия, Краснодарский край, пгт Сириус,
Олимпийский пр., 1.
Тел.: 8 (921) 856-61-75.
E-mail: kolosova.ed@talantiuspeh.ru

Address for correspondence:

Ekaterina D. Kolosova
Sirius University of Science and Technology
1 Olympic Ave
Sirius settlement, Krasnodar Region
354349 Russian Federation
Phone: +7 (921) 856-61-75.
E-mail: kolosova.ed@talantiuspeh.ru

Образец цитирования:

Е.Д. Колосова, Д.А. Лисица, О.Н. Демидов,
Д.А. Богданова «Сверхэкспрессия PPM1D приводит
к провоспалительному цитокиновому профилю
в ответ на активацию NF-κB в клеточной линии
колоректального рака человека» // Российский
иммунологический журнал, 2025. Т. 28, № 3. С. 501-508.
doi: 10.46235/1028-7221-17190-POI

© Колосова Е.Д. и соавт., 2025

Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

E.D. Kolosova, D.A. Lisitsa, O.N. Demidov, D.A. Bogdanova
“PPM1D overexpression is associated with proinflammatory
cytokine profile in response to NF-κB activation in human
colorectal cancer cell line”, Russian Journal of Immunology/
Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2025, Vol. 28, no. 3,
pp. 501-508.
doi: 10.46235/1028-7221-17190-POI

© Kolosova E.D. et al., 2025

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

DOI: 10.46235/1028-7221-17190-POI

сией гена *PPM1D*. Клетки культивировали в стандартных условиях. Для проведения экспериментов использовали TNF в концентрации 20 нг/мл и GSK2830371 в концентрации 10 мкМ. Инкубирование клеток с GSK2830371 производили в течение суток и с TNF в течение 12 часов. Измерение продукции цитокинов оценивали при помощи мультиплексной технологии xMAP INTELLIFLEX, а измерение экспрессии генов оценивали методом ПЦР в реальном времени. При мультиплексной оценке уровня секреции цитокинов было обнаружено, что ни инкубация клеток с GSK2830371, ни нокаут *PPM1D* не приводят к изменениям в цитокиновом профиле без стимуляции по сравнению с интактной клеточной линией. В случае стимуляции пути NF-κB с помощью TNF и ингибирования *PPM1D* также не выявлено значительного увеличения продукции провоспалительных цитокинов и факторов роста. А при оценке клеточной линии HT-29 со сверхэкспрессией *PPM1D* при помощи ПЦР в реальном времени наблюдалось статистически значимое увеличение уровня экспрессии *TNF*, *IL-8* и *IL-1b* в ответ на обработку TNF по сравнению с линией дикого типа, что не согласуется с данными о негативной регуляции пути NF-κB фосфатазой *PPM1D*. В результате работы показано, что нокаут гена *PPM1D* существенно не влиял на уровень цитокинов (IL-8, GM-CSF и др.), находящихся под контролем транскрипционного фактора NF-κB в случае индукции TNF, в сравнении с использованием селективного ингибитора GSK2830371. При этом повышенная экспрессия *PPM1D* приводила к увеличению экспрессии генов провоспалительных цитокинов, таких как *IL-8*, *TNF*, *IL-1b*, при индукции пути NF-κB с помощью TNF.

Ключевые слова: колоректальный рак, *PPM1D*, NF-κB, TNF, *IL-8*, *IL-1b*

PPM1D OVEREXPRESSION IS ASSOCIATED WITH PROINFLAMMATORY CYTOKINE PROFILE IN RESPONSE TO NF-κB ACTIVATION IN HUMAN COLORECTAL CANCER CELL LINE

Kolosova E.D.^{a, b}, Lisitsa D.A.^a, Demidov O.N.^{a, b}, Bogdanova D.A.^{a, b}

^a Sirius University of Science and Technology, Sirius settlement, Krasnodar Region, Russian Federation

^b Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. Protein phosphatase PPM1D (Protein phosphatase, Mg²⁺/Mn²⁺ dependent, 1D) is one of the key regulators of DNA damage-induced stress response, cell cycle and apoptosis. *PPM1D* overexpression is detected in a large number of both solid (lung cancer, breast cancer, etc.) and hematological (acute myeloid leukemia) malignancies, making PPM1D an important prognostic marker in oncology. Special attention should be paid to *PPM1D* overexpression in colorectal cancer (CRC), the third most common oncological disease since this index correlates with increased tumor size, metastasis, unfavorable survival prognosis, and the development of drug resistance. Drug resistance may be associated with direct dephosphorylation of p53 and other components of the ATM-p53 signaling pathway by PPM1D, also acting as a negative regulator of NF-κB. It is likely that *PPM1D* overexpression in CRC tumor cells may lead to a decreased synthesis of important proinflammatory cytokines and development of an immunosuppressive tumor microenvironment, which may significantly worsen the outcomes of therapy. At present, the role of PPM1D in regulating the inflammatory response in CRC remains insufficiently studied. The aim of this work was to compare the effect of chemical PPM1D inhibition using its selective inhibitor GSK2830371 and genetic knockout of *PPM1D* in the human CRC cell line HT-29 under conditions of the NF-κB signaling pathway induction with TNF treatment. In this study, we used the HT-29 cell line, as well as earlier obtained HT-29 cell line with *PPM1D* gene knockout, and HT-29 cell line with *PPM1D* overexpression. The cell lines were cultured under standard conditions. For experiments, TNF (20 ng/mL) and GSK2830371 (10 μM) were supplied. The cell lines were

incubated with GSK2830371 for 24 hours, and with TNF for 12 hours. Cytokine production was evaluated using xMAP INTELLIFLEX multiplex technology, and gene expression was measured by real-time PCR. Results: The multiplex assay of cytokine secretion levels revealed that, neither incubation of cells with GSK2830371 nor *PPM1D* knockout led to changes in the cytokine profile without stimulation as compared to the intact cell line, and did not cause a significant increase in production of pro-inflammatory cytokines and growth factors after TNF stimulation of the NF- κ B pathway. In the case of the NF- κ B pathway stimulation with TNF and *PPM1D* inhibition, we did not detect any significant increase in production of proinflammatory cytokines and growth factors. When evaluating the HT-29 cell line with *PPM1D* overexpression using real-time PCR, a statistically significant increase in *TNF*, *IL-8*, and *IL-1b* expression was observed in response to TNF treatment compared to the wild-type line. This finding is inconsistent with data on the negative regulation of NF- κ B pathway by *PPM1D* phosphatase. In general, it was shown that *PPM1D* gene knockout didn't significantly affect the level of cytokines (*IL-8*, GM-CSF, etc.) controlled by NF- κ B transcription factor in the case of TNF induction, as compared with effects of a selective inhibitor GSK2830371. Meanwhile, overexpression of *PPM1D* was associated with increased expression of proinflammatory cytokine genes, e.g., *IL-8*, *TNF*, *IL-1b*, upon induction of the NF- κ B pathway by TNF.

Keywords: colorectal cancer, PPM1D, NF- κ B, TNF, IL-8, IL-1b

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант РНФ № 25-25-20134).

Введение

Протеинфосфатаза PPM1D (Protein phosphatase, Mg^{2+}/Mn^{2+} dependent, 1D) участвует в большом количестве физиологически важных процессов клетки, таких как реакция на стресс, вызванная повреждением ДНК, регуляция клеточного цикла, клеточная гибель и т.д. [8]. На сегодняшний день показано, что PPM1D может выступать в роли протоонкогена [6]. Сверхэкспрессию *PPM1D* обнаруживают при нейробластоме, раке поджелудочной железы, легких, молочной железы, мочевого пузыря и т.д. [6]. Также, *PPM1D* сверхэкспрессируется в 60-80% случаев колоректального рака (КРР) [5, 6, 8]. При этом повышенная экспрессия *PPM1D* положительно коррелирует с размером опухоли и с отдельными метастазами, в том числе в лимфатические узлы [5]. Помимо этого, пациенты с повышенной экспрессией *PPM1D* имеют плохой прогноз выживаемости и резистентность к терапии, что делает *PPM1D* важным прогностическим маркером для КРР [5, 6].

КРР занимает третье место по распространенности среди всех видов рака, кроме того, у порядка 90% пациентов с метастазами наблюдается низкий эффект от противоопухолевой терапии, что связано в основном с приобретенной лекарственной резистентностью [4]. Одну из ключевых

ролей в развитии резистентности КРР к применяемым препаратам может играть ген *PPM1D*, так как он способен напрямую дефосфорилировать p53, основной регулятор клеточного цикла и важный компонент пути апоптоза, а также другие белки пути ATM-p53 [3, 7]. Важно отметить, что PPM1D также является негативным регулятором NF- κ B [1]. Ингибирование NF- κ B через PPM1D происходит как p38-зависимым, так и независимым образом [1]. Вероятно, что сверхэкспрессия *PPM1D* в опухолевых клетках может приводить к снижению синтеза важных провоспалительных цитокинов и развитию иммуносупрессивного окружения опухоли, что может значительно ухудшать исход терапии.

Отдельно стоит отметить перспективный таргетный препарат GSK2830371, который является высокоселективным ингибитором PPM1D, связывающимся с уникальным субдоменом, расположенным рядом с каталитическим сайтом PPM1D [2]. Обработка раковых клеток GSK2830371 увеличивает фосфорилирование субстратов PPM1D и вызывает p53-зависимое ингибирование роста клеток различных типов рака, например, в линиях гемопоэтических опухолевых клеток и в клетках опухоли молочной железы, несущих *TP53* дикого типа [2].

В нашей работе мы оценили цитокиновый профиль клеток КРР человека с нокаутом и со сверхэкспрессией гена *PPM1D* как в интактном состоянии, так и в случае активации пути NF- κ B с помощью TNF.

Материалы и методы

Клеточные линии

В экспериментах использовали клеточную линию KPP человека HT-29 (Kerafast, США). Также, в работе были использованы ранее полученные линия HT-29 с нокаутом гена *PPM1D* и линия HT-29 с повышенной экспрессией *PPM1D*.

Клеточные линии культивировали в культуральной среде DMEM (Servicebio, Китай), содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки (Cytiva, США), 150 мг L-глутамина (Thermo Fisher, США) и 10 мг пенициллина и стрептомицина (Servicebio, Китай). Клетки культивировали в пластиковых фласках с адгезионным покрытием (Eppendorf, Германия) в CO₂-инкубаторе (Binder, Германия) в атмосфере 5% CO₂ и при температуре 37 °C.

Измерение продукции цитокинов

Анализ продукции цитокинов в культуральной среде от клеточных линий проводили с использованием мультиплексной технологии xMAP INTELLIFLEX (Luminex, США) и набора MILLIPLEX MAP Human Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel (Merck, США) в соответствии с протоколом, рекомендованным производителем. Для нормализации полученных данных был использован Z-score анализ.

Измерение экспрессии генов методом ПЦР в реальном времени

Тотальную РНК выделяли из клеток при помощи реагента ExtractRNA (Евроген, Россия) в соответствии со стандартным протоколом производителя. Одноцепочечную комплементарную ДНК (кДНК) получали путем обратной транскрипции 1000 нг РНК с использованием набора RT-PCR MINT (Евроген, Россия). ПЦР в реальном времени проводили с помощью реагента 5X qPCRMix-HS SYBR + LowROX (Евроген, Россия) в соответствии с инструкцией производителя. Данные нормировали на экспрессию гена домашнего хозяйства *GAPDH*. Режим амплификации был одинаков для всех праймеров: 95 °C 5 минут, 40 циклов 95 °C 15 секунд и 60 °C 60 секунд. Каждый образец анализировали в трех технических повторностях. Экспрессию генов анализировали методом 2^{-ΔΔC_t}. Последовательности праймеров для гена *GAPDH* (прямой: GTCTCCTCTGACTTCACCAGCG, обратный: ACCACCCTGTTGCTGTAGCCAA), для гена *TNF* (прямой: CTCTTCTGCCTGCTGCACCTTTG, обратный: ATGGGCTACAGGCTTGTCACTC), для гена *IL-8* (прямой: GTTTTTGAAGAGGGCTGAGAATTC, обратный: ATGAAGTGTTGAAGTAGATTTGCTTG) и для

гена *IL-1b* (прямой: AGCTACGAATCTCCGACCAC, обратный: CGTTATCCCATGTGTCGAAGAA).

Статистический анализ

Для статистической обработки данных использовали программу GraphPad Prism 9.5. Экспериментальные данные анализировали 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

Предыдущие исследования показали, что *PPM1D* является негативным регулятором пути NF-κB и нокаут данного гена приводит к увеличению воспалительного ответа [1]. В рамках нашего исследования мы провели сравнительный анализ химического ингибирования *PPM1D* посредством селективного ингибитора GSK2830371 и генетического нокаута *PPM1D* на линии KPP человека HT-29 в условиях индукции сигнального пути NF-κB при обработке TNF. По результатам мультиплексного анализа цитокинов было обнаружено, что ни инкубация клеток с GSK2830371, ни нокаут *PPM1D* не приводят к изменениям в цитокиновом профиле без стимуляции по сравнению с интактной клеточной линией (рис. 1А). Предполагалось, что нокаут *PPM1D* или инкубация с GSK2830371 приведет к увеличению секреции TNF-индуцированных воспалительных цитокинов. Однако общая тенденция показывает, что нокаут *PPM1D* и использование химического ингибитора GSK2830371 не приводят к значительному увеличению продукции провоспалительных цитокинов и факторов роста (рис. 1А). Ранее J. Chew и соавт. показали, что нокаут *PPM1D* в клеточной линии HeLa приводит к увеличению экспрессии *TNF* и *IL-8* в ответ на *IL-1* [1]. В данном случае ни нокаут *PPM1D*, ни ингибирование с помощью GSK2830371 не приводили к увеличению секреции *IL-8* в ответ на TNF (рис. 1Б).

Показано, что NF-κB является активатором транскрипции в том числе и *PPM1D*, что создает петлю негативной обратной связи, так как *PPM1D* дефосфорилирует NF-κB (рис. 2А) [1]. При этом опухоли KPP часто сверхэкспрессируют *PPM1D* [5, 6]. Была проведена оценка экспрессии генов провоспалительных цитокинов под контролем транскрипционного фактора NF-κB методом ПЦР в реальном времени на линиях HT-29 дикого типа и со сверхэкспрессией

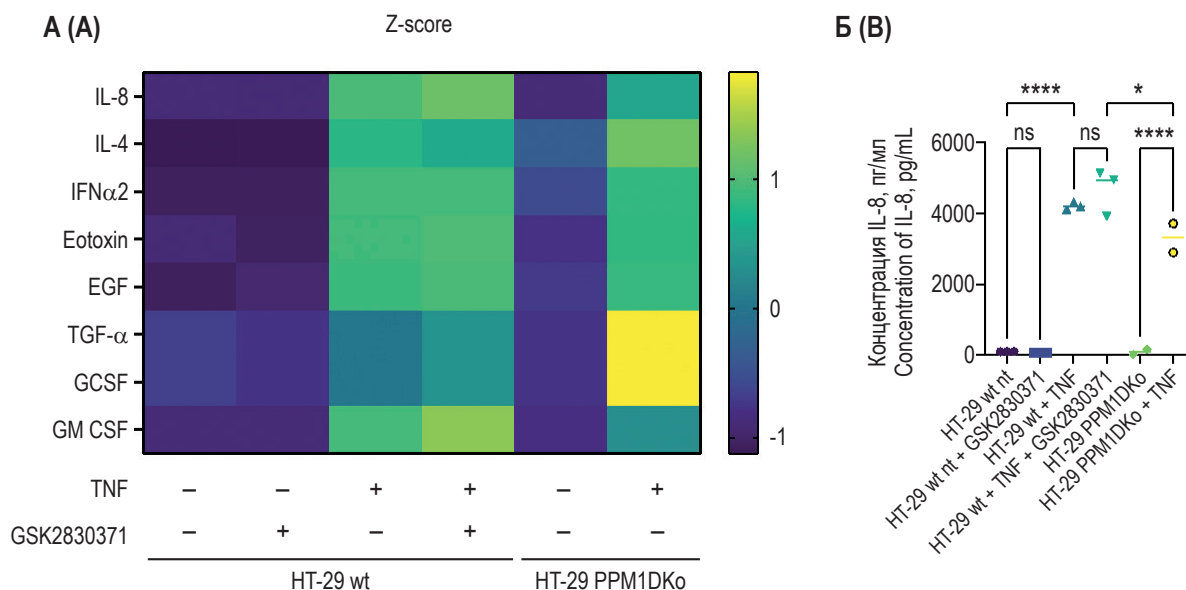


Рисунок 1. Уровень концентрации цитокинов в культуральной среде от клеточных линий HT-29 дикого типа и с нокаутом PPM1D при нормальных условиях, при ингибировании GSK2830371 и при их индукции TNF

Примечание. А – относительная экспрессия различных цитокинов и факторов роста в клеточной линии HT-29 дикого типа (HT-29 wt) при инкубации с TNF (20 нг/мл) и с инкубацией с селективным ингибитором PPM1D GSK2830371 (10 мкМ) и относительная экспрессия различных цитокинов и факторов роста клеточной линии HT-29 с нокаутом гена PPM1D (HT-29 PPM1DKo) при инкубации с TNF (20 нг/мл). Инкубацию с GSK2830371 производили в течение суток. Инкубирование клеток с TNF производили в течение 12 часов. Данные нормализованы и представлены в виде Z-оценок. Б – концентрация цитокина IL-8 (пг/мл). Статистический анализ проведен с помощью One-way ANOVA теста; * – $p < 0,05$, **** – $p < 0,0001$, ns (non-significant) – нет разницы.

Figure 1. Cytokine concentration levels in culture medium from wild-type and PPM1D knockout HT-29 cell lines under normal conditions, upon inhibition with GSK2830371, and upon their induction by TNF

Note. A, relative expression of various cytokines and growth factors in the wild-type HT-29 cell line (HT-29 wt) during incubation with TNF (20 ng/mL) and with the selective PPM1D inhibitor GSK2830371 (10 μ M), and relative expression of various cytokines and growth factors in the PPM1D gene knockout HT-29 cell line (HT-29 PPM1DKo) during incubation with TNF (20 ng/mL). Incubation with GSK2830371 was performed for 24 hours. Incubation of cells with TNF was carried out for 12 hours. Data are normalized and presented as Z-scores. B, IL-8 cytokine concentration (pg/mL). Statistical analysis was performed using the One-way ANOVA test; *, $p < 0.05$, ****, $p < 0.0001$, ns (non-significant) – no difference.

PPM1D. Данные линии инкубировались с TNF в концентрации 20 нг/мл в течение 3 часов. Было обнаружено, что в клеточной линии HT-29 со сверхэкспрессией происходит значительное увеличение уровня экспрессии таких цитокинов, как *TNF*, *IL-8* и *IL-1b*, по сравнению с линией HT-29 дикого типа в ответ на обработку TNF (рис. 2Б). Однако это не согласуется с данными о том, что PPM1D является негативным регулятором пути NF- κ B [1]. При этом Н. Zhong и соавт. показали, что повышение уровня экспрессии *PPM1D* в случае нейровоспаления ретинальных астроцитов наблюдается совместно с увеличением экспрессии мРНК провоспалительных цитокинов (*TNF*, *IL-8*, *IL-6*, *IL-1b*) [9]. Данные литературы противоречивы, и наша работа подчеркивает, что PPM1D может оказывать различное влияние на сигнальный путь NF- κ B, что требует дальнейше-

го изучения. Особенно актуальным это является в опухолевых моделях КРР, где высокий процент пациентов с сверхэкспрессией *PPM1D*. При этом стоит отметить, что такой эффект может быть обусловлен генетической нестабильностью в опухолевых клеточных линиях, где сверхэкспрессия или нокаут одного гена могут приводить к компенсаторным механизмам.

Выводы

В результате работы показано, что нокаут гена *PPM1D* существенно не влиял на уровень цитокинов (IL-8, GM-CSF и др.), находящихся под контролем транскрипционного фактора NF- κ B в случае индукции TNF, в сравнении с использованием селективного ингибитора GSK2830371. При этом повышенная экспрессия *PPM1D* приводила

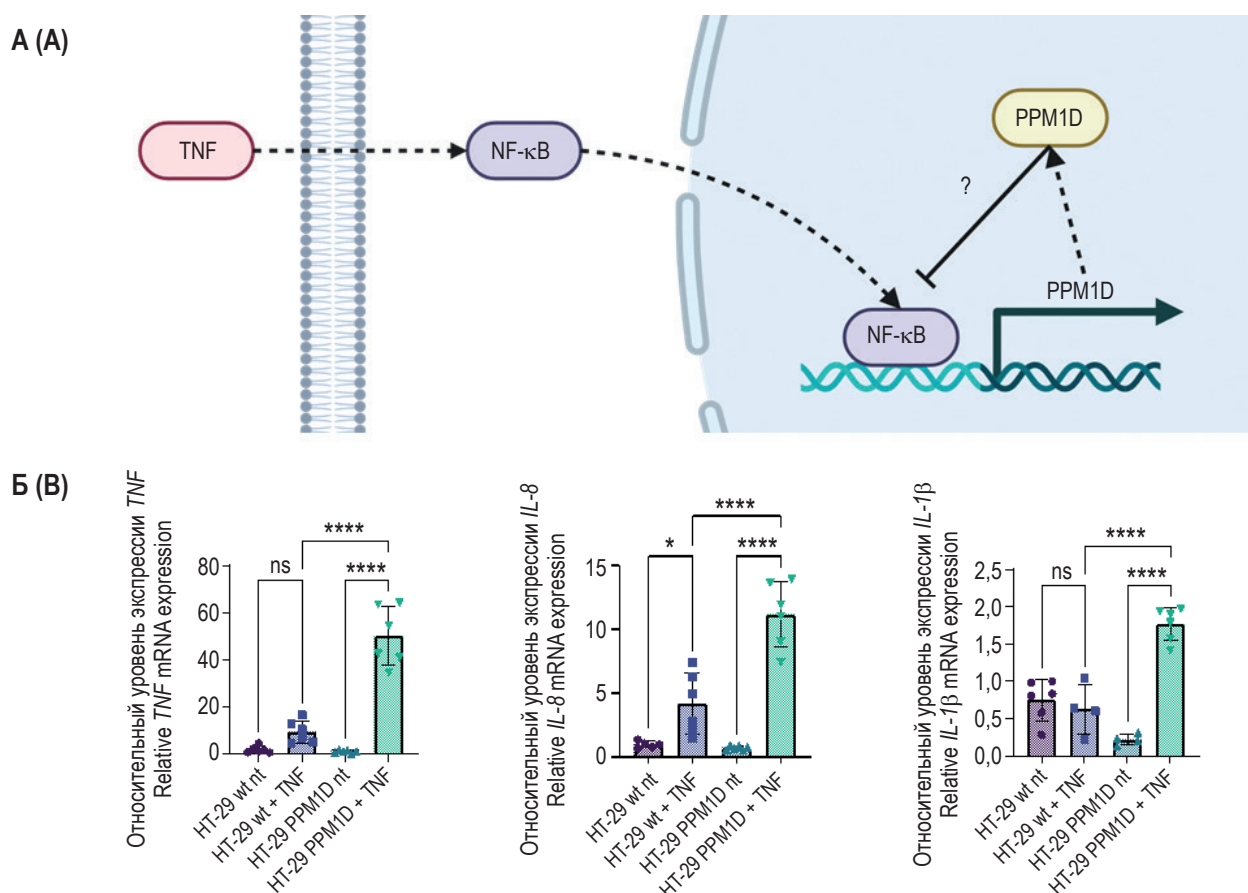


Рисунок 2. Относительный уровень экспрессии *TNF*, *IL-8* и *IL-1β* в клетках HT-29 дикого типа и со сверхэкспрессией *PPM1D*

Примечание. А – схема негативной обратной связи NF-κB и PPM1D (схема адаптирована из [7]). Б – относительный уровень экспрессии *TNF*, *IL-8* и *IL-1β*, нормированные по гену домашнего хозяйства *GAPDH*, у линии HT-29 дикого типа (HT-29 wt) и у линии HT-29 со сверхэкспрессией *PPM1D* (HT-29 PPM1D). Инкубация с TNF (20 нг/мл) проводили в течение 3 часов. Статистический анализ проведен с помощью One-way ANOVA теста; * – $p < 0,05$, **** – $p < 0,0001$, ns (non-significant) – нет разницы.

Figure 2. Relative expression levels of *TNF*, *IL-8* and *IL-1β* in wild-type and *PPM1D*-overexpressing HT-29 cells

Note. A, negative regulation of NF-κB and PPM1D (adapted from [7]). B, relative expression levels of *TNF*, *IL-8* and *IL-1β* normalized to the housekeeping gene *GAPDH* in wild-type HT-29 (HT-29 wt) and *PPM1D*-overexpressing HT-29 (HT-29 PPM1D) cells. Incubation with TNF (20 ng/mL) was performed for 3 hours. Statistical analysis was performed using the One-way ANOVA test; *, $p < 0.05$, ****, $p < 0.0001$, ns (non-significant) – no difference.

к увеличению экспрессии генов провоспалительных цитокинов, таких как *IL-8*, *TNF*, *IL-1β*, при индукции пути NF-κB с помощью TNF.

Это исследование выявило парадоксальную роль PPM1D в регуляции пути NF-κB в линии КРР человека. Данные, полученные на клеточной линии HT-29, противоречащие результатам, опубликованным на других клеточных линиях, могут объясняться отличным паттерном экспрессии других фосфатаз семейства PP2C, к которому принадлежит данная фосфатаза, в HT-29 [1, 9]. Обнаруженный фенотип может приводить к

иммуномодуляции в онкогенезе КРР и требует дальнейшего изучения. Хроническое воспаление провоцирует малигнизацию опухоли, при этом применение химических ингибиторов PPM1D может нивелировать эти последствия.

Благодарности

Выражаем искреннюю благодарность Prof. D. Mannel (Tübingen) за любезно предоставленный рекомбинантный человеческий TNF. Также выражаем благодарность С.А. Недоспасову за ценные комментарии по тексту рукописи.

Список литературы / References

1. Chew J., Biswas S., Shreeram S., Humaidi M., Wong E.T., Dhillon M.K., Teo H., Hazra A., Fang C.C., López-Collazo E., Bulavin D.V., Tergaonkar V. WIP1 phosphatase is a negative regulator of NF-kappaB signalling. *Nat. Cell Biol.*, 2009, Vol. 11, no. 5, pp. 659-666.
2. Gilmartin A.G., Faltg T.H., Richter M., Groy A., Seefeld M.A., Darcy M.G., Peng X., Federowicz K., Yang J., Zhang S.Y., Minthorn E., Jaworski J.P., Schaber M., Martens S., McNulty D.E., Sinnamon R.H., Zhang H., Kirkpatrick R.B., Nevins N., Cui G., Pietrak B., Diaz E., Jones A., Brandt M., Schwartz B., Heerding D.A., Kumar R. Allosteric Wip1 phosphatase inhibition through flap-subdomain interaction. *Nat. Chem. Biol.*, 2014, Vol. 10, no. 3, pp. 181-187.
3. Lagorgette L., Bogdanova D.A., Belotserkovskaya E.V., Garrido C., Demidov O.N. PP2C phosphatases – terminators of suicidal thoughts. *Cell Death Dis.*, 2024, Vol. 15, no. 12, 919. doi: 10.1038/s41419-024-07269-2.
4. Lee G.-Y., Lee J.-S., Son C.-G., Lee N.-H. Combating Drug Resistance in Colorectal Cancer Using Herbal Medicines. *Chin. J. Integr. Med.*, 2021, Vol. 27, no. 7, pp. 551-560.
5. Li Z.-T., Zhang L., Gao X.-Z., Jiang X.-H., Sun L.-Q. Expression and significance of the Wip1 proto-oncogene in colorectal cancer. *Asian Pac. J. Cancer Prev.*, 2013, Vol. 14, no. 3, pp. 1975-1979.
6. Peng T.S., He Y.H., Nie T., Hu X.D., Lu H.Y., Yi J., Shuai Y.F., Luo M. PPM1D is a prognostic marker and therapeutic target in colorectal cancer. *Exp. Ther. Med.*, 2014, Vol. 8, no. 2, pp. 430-434.
7. Uyanik B., Grigorash B.B., Goloudina A.R., Demidov O.N. DNA damage-induced phosphatase Wip1 in regulation of hematopoiesis, immune system and inflammation. *Cell Death Discov.*, 2017, Vol. 3, 17018. doi: 10.1038/cddiscovery.2017.18.
8. Zhang L., Hsu J.I., Goodell M.A. PPM1D in Solid and Hematologic Malignancies: Friend and Foe? *Mol. Cancer Res.*, 2022, Vol. 20, no. 9, pp. 1365-1378.
9. Zhong H., Cui L., Xu F., Chen L., Jiang L., Huang H., Xu J., Zhao X., Li L., Zeng S., Li M. Up-regulation of Wip1 involves in neuroinflammation of retinal astrocytes after optic nerve crush via NF-κB signaling pathway. *Inflamm. Res.*, 2016, Vol. 65, no. 9, pp. 709-715.

Авторы:

Колосова Е.Д. — лаборант-исследователь, направление «Иммунобиология и биомедицина», АНОО ВО «Научно-технологический университет «Сириус», пгт Сириус, Краснодарский край; лаборант-исследователь ФГБУН «Институт цитологии» Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия

Лисица Д.А. — лаборант-исследователь, направление «Иммунобиология и биомедицина», АНОО ВО «Научно-технологический университет «Сириус», пгт Сириус, Краснодарский край

Authors:

Kolosova E.D., Laboratory Assistant, Sirius University of Science and Technology, Sirius settlement, Krasnodar Region; Laboratory Assistant, Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russian Federation

Lisitsa D.A., Laboratory Assistant, Sirius University of Science and Technology, Sirius settlement, Krasnodar Region, Russian Federation

Демидов О.Н. — д.м.н., профессор АНОО ВО «Научно-технологический университет “Сириус”», пгт Сириус, Краснодарский край; ведущий научный сотрудник ФГБУН «Институт цитологии» Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия

Богданова Д.А. — аспирант, младший научный сотрудник, направление «Иммунобиология и биомедицина», АНОО ВО «Научно-технологический университет “Сириус”», пгт Сириус, Краснодарский край; младший научный сотрудник ФГБУН «Институт цитологии» Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия

Demidov O.N., PhD, MD (Medicine), Professor, Sirius University of Science and Technology, Sirius settlement, Krasnodar Region; Leading Researcher, Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russian Federation

Bogdanova D.A., Postgraduate Student, Junior Researcher, Sirius University of Science and Technology, Sirius settlement, Krasnodar Region; Junior Researcher, Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russian Federation

Поступила 05.05.2025
Отправлена на доработку 06.05.2025
Принята к печати 25.05.2025

Received 05.05.2025
Revision received 06.05.2025
Accepted 25.05.2025

ВЛИЯНИЕ *PHLOJODICARPUS SIBIRICUS* НА СУБПОПУЛЯЦИОННЫЙ СОСТАВ КЛЕТОК КРОВИ И ТИМУСА МЫШЕЙ С МОДЕЛИРОВАННОЙ ОПУХОЛЬЮ

Егоров А.Н.¹, Пашкина Е.А.², Гольдерова А.С.¹

¹ ФГАОУ ВО «Северо-Восточный федеральный университет имени М.К. Аммосова», г. Якутск, Республика Саха (Якутия), Россия

² ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Резюме. В настоящем исследовании было изучено воздействие экстракта *Phlojodicarpus sibiricus* на иммунный ответ у мышей линии C57Black/6 в условиях моделированной меланомы, индуцированной клеточной линией В16. Целью работы являлась оценка иммуномодулирующих свойств растительного экстракта в контексте онкогенеза. Для достижения поставленной цели был проведен эксперимент с формированием трех групп мышей: контрольная группа здоровых животных, группа с индуцированной меланомой, получавшая экстракт, и группа с меланомой, не получавшая экстракт. Опухоль меланомы моделировали путем введения суспензии клеток В16, а экстракт *Phlojodicarpus sibiricus* вводили перорально после проявления первых признаков роста меланомы. Оценка изменений в субпопуляционном составе лимфоцитов в крови и в тимусе проводилась методом проточной цитометрии с использованием специфических моноклональных антител для идентификации Т-лимфоцитов, Т-хелперов, Т-киллеров, В-лимфоцитов, НК-клеток и Т-регуляторных клеток. Полученные результаты исследования не достигли статистической значимости ($p < 0,05$), однако в тимусе наблюдались определенные тенденции к снижению содержания Т-регуляторных клеток и НК-клеток в группе, получавшей экстракт, по сравнению с группой, моделировавшей меланому. Данное снижение может указывать на потенциальное влияние экстракта на противоопухолевый иммунный ответ, а изменения в соотношении Т-хелперов и Т-киллеров свидетельствуют о возможной регуляции клеточного иммунитета. Снижение уровня В-лимфоцитов могло отражать переключение иммунного ответа с гуморального на клеточно-опосредованный, что может быть благоприятным при опухолевой патологии. На основании полученных результатов можно заключить, что экстракт *Phlojodicarpus sibiricus* оказывает модулирующее воздействие в условиях развития меланомы, что создает перспективы для дальнейших исследований в области иммуномодуляции и противоопухолевой терапии. Проведенное исследование позволило нам сделать следующие выводы о тенденции к снижению содержания Т-регуляторных

Адрес для переписки:

Егоров Андрей Николаевич
ФГАОУ ВО «Северо-Восточный федеральный
университет имени М.К. Аммосова»
677013, Россия, Республика Саха (Якутия),
г. Якутск, ул. Белинского, 58.
Тел.: 8 (914) 826-27-23.
E-mail: 291219942014@mail.ru

Address for correspondence:

Andrey N. Egorov
M. Ammosov North-Eastern Federal University
58 Belinsky St
Yakutsk, Republic of Sakha (Yakutia)
677013 Russian Federation
Phone: +7 (914) 826-27-23.
E-mail: 291219942014@mail.ru

Образец цитирования:

А.Н. Егоров, Е.А. Пашкина, А.С. Гольдерова «Влияние
Phlojodicarpus sibiricus на субпопуляционный состав
клеток крови и тимуса мышей с моделированной
опухолью» // Российский иммунологический журнал,
2025. Т. 28, № 3. С. 509-514.
doi: 10.46235/1028-7221-17182-EOP

© Егоров А.Н. и соавт., 2025

Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

A.N. Egorov, E.A. Pashkina, A.S. Golderova "Effect
of *Phlojodicarpus sibiricus* on the subpopulation profile of blood
cells and thymus of mice with a simulated tumor", Russian
Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii
Zhurnal, 2025, Vol. 28, no. 3, pp. 509-514.
doi: 10.46235/1028-7221-17182-EOP

© Egorov A.N. et al., 2025

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

DOI: 10.46235/1028-7221-17182-EOP

клеток и NK-клеток в группе, получавшей экстракт, что может указывать на уменьшение их влияния на противоопухолевый иммунный ответ. Наблюдалось снижение уровня В-лимфоцитов в крови, что может свидетельствовать о смещении иммунного ответа от гуморального к клеточно-опосредованному. Обнаруженные тенденции указывают на потенциальную роль данного растительного экстракта как иммуномодулирующего агента, однако для формулировки окончательных выводов необходимы дополнительные исследования. Ключевым аспектом является анализ механизмов действия экстракта и его воздействие на различные аспекты иммунного ответа. В частности, стоит исследовать как экстракт активирует лимфоциты и регулирует процессы клеточного апоптоза.

Ключевые слова: клеточная линия B16, меланома, экстракт, *Phlojodicarpus sibiricus*, C57Black/6

EFFECT OF *PHLOJODICARPUS SIBIRICUS* ON THE SUBPOPULATION PROFILE OF BLOOD CELLS AND THYMUS OF MICE WITH A SIMULATED TUMOR

Egorov A.N.^a, Pashkina E.A.^b, Golderova A.S.^a

^a M. Ammosov North-Eastern Federal University, Yakutsk, Republic of Sakha (Yakutia), Russian Federation

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

Abstract. The present study concerned the effect of *Phlojodicarpus sibiricus* extract on immune response in melanoma model induced by the B16 cells in C57Black/6 mice. The aim of our work was to evaluate the immunomodulatory properties of this plant extract in the context of oncogenesis. To achieve this goal, an experiment was conducted with three groups of mice: a control group of healthy animals, a group with induced melanoma receiving the extract, and a non-treated melanoma group. Melanoma malignancy was modeled by injecting a suspension of B16 cells, and the extract of *Phlojodicarpus sibiricus* was administered orally after the first signs of developing melanoma. Changes in lymphocyte subpopulation profile of blood and thymus were assessed using flow cytometry with specific monoclonal antibody markers for T lymphocytes, T helper cells, T killer cells, B lymphocytes, NK cells, and T regulatory cells. The results obtained did not reach statistical significance ($p < 0.05$). However, certain trends were observed in the thymus, where a decreased content of T regulatory cells and NK cells was noted in the group receiving the extract compared to the melanoma group. This reduction may indicate a potential influence of the extract on the antitumor immune response, whereas changes in the ratio of T helper/T killer cells suggest possible regulation of cellular immunity. The reduction in B lymphocyte levels may reflect a shift in immune response from humoral to cell-mediated pattern, which could be beneficial in the context of tumor pathology. The extract of *Phlojodicarpus sibiricus* appears to modulate melanoma development, suggesting a potential for further research in immunomodulation and anti-tumor therapy. The study has revealed a reduced level of T regulatory cells and NK cells in the extract group, thus suggesting a diminished antitumor immune response. Moreover, a decline in B lymphocytes suggests a shift from humoral to cell-mediated immunity. These findings highlight the potential activity of extract as an immunomodulating agent. However, further research is necessary to confirm these effects. Mechanistic analysis of the extract action would be crucial, particularly, the ways of lymphocyte activation and apoptosis regulation.

Keywords: cell line B16, melanoma, extract, *Phlojodicarpus sibiricus*, C57Black/6 mice

Работа выполнена в лаборатории медицинских биотехнологий по теме «Разработка новых технологий в области регенеративной медицины» (FSRG-2025-0010).

Введение

В народной медицине известно много целебных растений для лечения и профилактики раз-

личных заболеваний в том числе для поддержания иммунитета. В последние годы изучается множество фитопрепаратов, которые способны скорректировать активность иммунной системы за счет влияния на такие ключевые эффекты, как пролиферация, дифференцировка и цитокиновый ответ [4, 9].

Особый интерес представляют растения, произрастающие в резко континентальном климате.

К таким регионам относится Якутия [4]. У народа Саха в народной медицине в качестве лечения нервных болезней, патологий сердца, рака пищевода и желудка использовали корни и корневища вздутоплодника сибирского (лат. *Phlojodicarpus sibiricus*) [1]. Данный вид растения занесена в красную книгу Якутии [3]. *Phlojodicarpus sibiricus* является источником фенольных соединений, в том числе кумаринов, бензофуранов, умбеллиферона и других веществ [5, 6, 11].

В своих исследованиях Шурыгин А.Я. и соавт. [7] указывают, что экстракт *Ph. sibiricus* увеличивает нейроростовые показатели по сравнению с контролем. Также ранее было исследовано его антипролиферативное действие на клеточных линиях MCF-7 [2]. Однако его влияние на иммунную систему не исследовалось.

Т-клетки играют ключевую роль в клеточно-опосредованном противоопухолевом иммунитете [8, 10], поскольку они обладают разнообразным репертуаром TCR, специфически распознающим огромное количество опухолевых неоантигенов, называемых TSA [15], возникающих в результате геномных мутаций или вирусной инфекции.

Регуляторные Т-клетки являются супрессорами и играют существенную роль во многих иммунологических процессах, в том числе снижают противоопухолевый иммунитет и иммунитет к инфекциям [12]. В свою очередь, Treg модулируют агрессивность клеточной иммунной реакции и отношения между CD3⁺Т-клетками и, таким образом, они ответственны за развитие иммунной реакции и иммунологической толерантности. Высокая инфильтрация Treg, по-видимому, способствует развитию рака из-за критической роли иммунной толерантности в процессе развития рака. Кроме того, повышенные уровни Treg определяют более высокую агрессивность опухоли при различных видах рака [13].

Целью настоящего исследования является оценка иммунологической эффективности растительного экстракта *Phlojodicarpus sibiricus* при моделированной опухоли меланомы у мышей линии C57Black/6.

Материалы и методы

В эксперименте были использованы линейные лабораторные мыши C57Bl/6 (самцы) в возрасте 3-4 недель. Грызунов разделили на три группы по 5 мышей в каждой: 1-я группа — здоровые мыши; 2-я группа — мыши, привитые клеточной линией B16 и с пероральным введением экстракта; 3-я группа — мыши, привитые клеточной линией B16, но не получавшие экстракт. Для моделирования опухоли меланомы, мышам 2-й и 3-й группы вводили под холку суспензию клеток B16 в количестве 100 тыс. клеток на 0,1 мл физио-

логического раствора. После первого появления признаков роста опухоли (8-9-й день), мышам 2-й группы ежедневно перорально вводили 20 мкл экстракта *Phlojodicarpus sibiricus*, предварительно разведенной физиологическим раствором в концентрации 100 мг/мл.

Исследование относительного содержания субпопуляций лимфоцитов проводили в крови и в суспензии тимуса, полученной общепринятой методикой. Мышей из эксперимента выводили путем декапитации, при достижении опухоли меланомы больше 1 см в диаметре. Для определения иммунных клеток использовали проточный цитофлуориметр LongCyte (Challenbio, Китай). Анализ субпопуляций лимфоцитов выполняли с помощью моноклональных антител (Elabscience, Китай): CD45, CD4, CD3, CD16/32, CD19 — для определения Т-лимфоцитов, Т-хелперов, Т-киллеров, NK-клеток и В-лимфоцитов; CD25, CD8a, CD3, FoxP3 — для идентификации Т-регуляторных клеток.

Статистическая обработка полученных данных проводилась с использованием непараметрического критерия Манна–Уитни. Результаты представлены в виде медианы интерквартильного размаха. Результаты считались статистически значимыми при величинах достигнутого уровня значимости $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Анализ данных содержания субпопуляций лимфоцитов в тимусе и крови мышей не выявил статистически значимых различий между группами, связанных с малым размером выборки в сравниваемых группах. Тем не менее нами получены несколько характерных тенденций, которые были связаны с относительным содержанием Т-регуляторных лимфоцитов (CD3⁺CD25⁺FoxP3⁺) (табл. 1).

Относительное содержание Т-регуляторных клеток ($p = 0,056$) в тимусе мышей 2-й группы, оказалась ниже в 2,41 раза, чем в 3-й группе мышей с опухолью. Причина такого снижения в тимусе этих клеток, возможно, связана с тем, что их содержание в крови, наоборот, имеет тенденцию к повышению ($p = 0,056$) по сравнению с мышами контрольной группы и 3-й группы с опухолью, т. е. у мышей 2-й группы экстракт *Phlojodicarpus sibiricus* приводит к ускоренной миграции Т-регуляторных клеток на периферию.

Содержание NK-клеток в тимусе мышей 2-й группы имеет тенденцию к снижению ($p = 0,056$) по сравнению с 3-й группой в 1,42 раза. Известно, что NK-клетки не проходят дифференцировку в тимусе, они мигрируют из костного мозга в кровь и затем мигрируют в ткани, где осуществляют врожденную иммунную защиту, называ-

ТАБЛИЦА 1. ОТНОСИТЕЛЬНОЕ СОДЕРЖАНИЕ КЛЕТОК ИММУННОЙ СИСТЕМЫ В ТИМУСЕ И КРОВИ, Ме ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

TABLE 1. THE RELATIVE CONTENT OF IMMUNE SYSTEM CELLS IN THE THYMUS AND BLOOD, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

Наименование показателя (Т – тимус, К – кровь) Name of the indicator (T, thymus; B, blood)		Название группы Group name			p
		Контроль 1-я группа Control 1 st group (n = 5)	Опухоль + экстракт 2-я группа Cancer + extract 2 nd group (n = 5)	Опухоль 3-я группа Cancer 3 rd group (n = 5)	
CD45⁺CD3⁺ (Т-лимфоциты) (T lymphocytes)	Т (Т)	24,24 (18,56-39,61)	36,94 (32,22-40,68)	41,49 (35,14-52,19)	
	К (В)	78,01 (65,59-78,17)	56,29 (49,83-72,72)	76,63 (75,09-79,64)	
CD45⁺CD3⁺CD4⁺ (Т-хелперы) (T helpers)	Т (Т)	18,80 (14,04-29,56)	27,55 (24,65-32,51)	30,87 (27,09-37,92)	
	К (В)	39,68 (33,98-46,58)	31,53 (30,62-36,11)	35,87 (30,91-38,92)	
CD45⁺CD3⁺CD4⁻ (Т-киллеры) (T killers)	Т (Т)	5,44 (4,52-10,04)	7,63 (6,18-10,44)	10,62 (8,05-14,27)	
	К (В)	29,35 (24,79-42,89)	25,69 (17,83-37,52)	39,00 (37,77-48,01)	
CD3⁺CD25⁺FoxP3⁺CD8a⁻ (Т-регулят.) (T regulation)	Т (Т)	9,46 (4,33-13,65)	6,48 (5,87-12,12)	15,68 (11,33-21,13)	0,056 ²⁻³
	К (В)	1,52 (1,06-5,34)	6,25 (5,61-16,05)	4,33 (3,87-12,25)	0,056 ¹⁻² 0,056 ¹⁻³
CD45⁺CD19⁺CD3⁻ (В-лимфоциты) (B lymphocytes)	Т (Т)	2,45 (1,29-3,20)	1,07 (0,87-3,81)	2,69 (1,49-3,62)	
	К (В)	9,13 (8,27-14,75)	32,82 (18,19-40,08)	13,59 (10,20-18,63)	0,044 ¹⁻² 0,076 ²⁻³
CD45⁺CD16/32⁺CD3⁻ (NK-клетки) (NK cells)	Т (Т)	1,35 (0,84-2,54)	1,31 (0,84-2,27)	1,87 (1,69-3,82)	0,056 ²⁻³
	К (В)	18,86 (15,48-24,94)	37,27 (21,36-40,29)	20,65 (17,30-24,22)	

Примечание. Статистическая обработка полученных данных проводилась с использованием непараметрического критерия Манна–Уитни. Результаты представлены в виде медианы интерквартильного размаха. Результаты считались статистически значимыми при величинах достигнутого уровня значимости $p < 0,05$.

Note. Statistical processing of the obtained data was carried out using the nonparametric Mann–Whitney criterion. The results are presented as the median of the interquartile range. The results were considered statistically significant when the achieved significance level was $p < 0.05$.

емую естественной цитотоксичностью, которая важна для защиты организма от опухолей. По содержанию НК-клеток, у 2-й группы мышей она оказалась максимальной по сравнению с двумя группами, что указывает на некоторую степень активации цитотоксичность лимфоидных клеток врожденного иммунитета фоне введения экстракта.

Если рассматривать сдвиги по медиане распределения содержания лимфоцитов в крови, можно отметить, что у мышей 2-й группы характерны минимальные значения Т-лимфоцитов, Т-хелперов и Т-киллеров по сравнению с мы-

шами 3-й группы и контролем, хотя различия не значимы или отсутствуют тенденции.

Следует отметить, что добавление экстракта мышам 2-й группы приводит к существенному повышению В-лимфоцитов ($p = 0,044$) в крови по сравнению с контрольной группой в 3,59 раза и по сравнению с 3-й группой мышей с опухолью не имеет статистической значимости, но имеется тенденция ($p = 0,076$) к повышению. Существует множество противоречивых функций В-клеток в противоопухолевом иммунитете, роль В-клеток в разных типах опухолей различна.

По полученным нами данным можно предположить, что введение экстракта мышам 2-й груп-

пы с моделированной опухолью приводит к снижению Т-лимфоцитов, Т-хелперов и Т-киллеров и к одновременному повышению относительного содержания Т-регуляторных, В-лимфоцитов и НК-клеток. Повышение последних трех субпопуляций лимфоцитов может свидетельствовать о некотором иммуномодулирующем действии экстракта.

По отношению к В-лимфоцитам снижение можно объяснить смещением иммунного ответа от гуморального к клеточно-опосредованному, которое может положительно повлиять в контексте опухолевой защиты организма.

Таким образом, можно предположить, что экстракт *Phlojodicarpus sibiricus* оказывает модульное влияние на тимус у мышей при моделировании опухоли меланомы клеточной линией В16. Хотя полученные результаты неоднозначны, можно предположить, что тенденция к снижению Т-регуляторных клеток может указывать на потенциал иммуномодулирующего агента, способного снижать уровень Т-регуляторных клеток в условиях моделированной опухоли. Увеличение Т-лимфоцитов, Т-хелперов, Т-киллеров относительно 1-й группы подчеркивает потенциал комбинированного действия для стимуляции адаптивного иммунитета, а снижение относительно 3-й группы может указывать на компенсаторные механизмы, активируемые экстрактом. Снижение НК-клеток и В-лимфоцитов требует дополнительных исследований.

Выводы

Все вышесказанное дает нам сделать следующие выводы:

1. Анализ статистических данных не выявил значимых различий в субпопуляциях лимфоцитов, но наблюдались тенденции к изменениям, особенно по отношению к Т-регуляторным клеткам.

2. Относительное содержание Т-регуляторных клеток в тимусе мышей, получивших экстракт, было в 2,41 раза ниже по сравнению с мышами с опухолью, что может свидетельствовать о возможных изменениях в миграции этих клеток. В то же время наблюдалось увеличение их числа в крови, что указывает на более быструю миграцию Т-регуляторных клеток в периферические ткани.

3. Относительное содержание НК-клеток в тимусе мышей, получавших экстракт, демонстрировало тенденцию к снижению. Эти результаты свидетельствуют о значительной активации данных клеток, что имеет важное значение для естественной цитотоксической активности против опухолевых образований.

4. Медиана содержания Т-лимфоцитов, Т-хелперов и Т-киллеров: у мышей 2-й группы отмечены минимальные показатели по сравнению с контрольной и 3-й группами. Это указывает на изменения в клеточном составе, хотя различия не достигли статистической значимости.

5. Введение экстракта у мышей 2-й группы вызвало заметное увеличение количества В-лимфоцитов в крови. Данная реакция является противоречивой, так как функция В-клеток в контексте противоопухолевого иммунитета может изменяться в зависимости от особенностей конкретной опухоли.

6. Полученные результаты свидетельствуют о том, что экстракт *Phlojodicarpus sibiricus* способен снижать уровень Т-лимфоцитов, при этом увеличивая количество Т-регуляторных клеток, В-лимфоцитов и НК-клеток, что указывает на потенциальное иммуномодулирующее действие. Данный сдвиг может свидетельствовать о переходе иммунного ответа от гуморального к клеточно-опосредованному, что, в свою очередь, может благоприятно сказаться на защите организма от опухолевых процессов.

Список литературы / References

1. Георгиевский В.П. Биологически активные вещества лекарственных растений. Новосибирск: Наука. Сибирское отделение, 1990. 336 с. [Georgievsky V.P. Biologically Active Substances of Medicinal Plants]. Novosibirsk: Nauka. Sibirskoye otdeleniye, 1990. 336 p.
2. Егоров А.Н., Тихонов Д.Г., Гольдерова А.С. Антипролиферативное воздействие дикорастущих ягод и вздутоплодника сибирского Северо-Восточной Сибири на клетки рака молочной железы MCF-7 // Успехи молекулярной онкологии, 2024. Т. 11, № 3. С. 126-132. [Egorov A.N., Tikhonov D.G., Golderova A.S. Antiproliferative Effect of wild berries and *Phlojodicarpus sibiricus* on MCF-7 breast cancer cells from Northeast Siberia. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology*, 2024, Vol. 11, no. 3, pp. 126-132. (In Russ.)]
3. Красная книга Республики Саха (Якутия). Т. 1. Редкие и находящиеся под угрозой исчезновения виды растений и грибов. М.: Реарт, 2017. 420 с. [Red Data Book of the Republic of Sakha (Yakutia). Vol. 1. Rare and Endangered Species of Plants and Fungi. Moscow: Reart, 2017. 420 p.
4. Самойлова Г.С., Горячко М.Д., Дьяконов В.М., Горячко М.Д., Прокинова А.Н., Павлинов П.С. Якутия. Саха (Якутия). В: Большая российская энциклопедия. [Электронный ресурс]. Актуализация: редак-

ция БРЭ, 2020. Режим доступа: <https://web.archive.org/web/20221206175520/https://bigenc.ru/geography/text/5753444>. [Samoilova G.S., Goryachko M.D., Diakonov V.M., Goryachko M.D., Prokinova A.N., Pavlinov P.S. Sakha (Yakutia). In: Great Russian Encyclopedia [Electronic resource]. Updating: GRE editors, 2020. Available at: <https://web.archive.org/web/20221206175520/https://bigenc.ru/geography/text/5753444>.

5. Ханды М.Т., Кочкин Д.В., Томилова С.В., Ключин А.Г., Галишев Б.А., Носов А.М. Ростовые и биосинтетические характеристики суспензионных культур клеток *Phlojodicarpus sibiricus* // Физиология растений, 2021. Т. 68, № 3. С. 326-336. [Khandy M.T., Kochkin D.V., Tomilova S.V., Klyushin A.G., Galishev B.A., Nosov A.M. Growth and biosynthetic characteristics of *Phlojodicarpus sibiricus* cell suspension cultures. *Russian Journal of Plant Physiology*, 2021, Vol. 68, no. 3, pp. 569-578.

6. Ханды М.Т., Кочкин Д.В., Томилова С.В., Галишев Б.А., Ключин А.Г., Носов А.М. Получение и фитохимический скрининг каллусных и суспензионных культур клеток вздутоплодника сибирского *Phlojodicarpus sibiricus* (Steph. ex Spreng.) K.-Pol // Биотехнология, 2020. Т. 36, № 5. С. 54-61. [Khandy M.T., Kochkin D.V., Tomilova S.V., Galishev B.A., Klyushin A.G., Nosov A.M. Obtainment and Phytochemical Screening of Callus and Suspension Cell Cultures of *Phlojodicarpus sibiricus* (Steph. ex Spreng.) K.-Pol. *Biotechnologiya = Biotechnologiya*, 2020, Vol. 36, no. 5, pp. 54-61. (In Russ.)]

7. Шурыгин А.Я., Асеева Т.А., Скороход Н.С., Абрамова Н.О., Герасименко Ю.Г. Влияние на нейритный рост спинальных ганглиев эмбрионов цыплят этанольного экстракта вздутоплодника сибирского *Phlojodicarpus sibiricus* // Успехи современного естествознания, 2005. № 10. С. 90-91. [Shurigin A.Ya., Aseeva T.A., Skorokhod N.S., Abramova N.O., Gerasimenko Yu.G. Influence on Neurite Growth of Spinal Ganglia of Chicken Embryos by Ethanol Extract of *Phlojodicarpus sibiricus*. *Uspekhi sovremennogo yestestvoznaniya = Achievements in Modern Natural Science*, 2005, no. 10, pp. 90-91. (In Russ.)]

8. Durgeau A., Virk Y., Corgnac S., Mami-Chouaib F. Recent advances in targeting CD8 T-cell immunity for more effective cancer immunotherapy. *Front. Immunol.*, 2018, Vol. 9, 14. doi: 10.3389/fimmu.2018.00014.

9. Mahmoudi Z., Soleimani M., Saidi A., Khamisipour G., Azizsoltani A. Effects of *Foeniculum vulgare* ethanol extract on osteogenesis in human mesenchymal stem cells. *Avicenna J. Phytomed.*, 2013, Vol. 3, pp. 135-142.

10. Minetto P., Guolo F., Pesce S., Greppi M., Obino V., Ferretti E., Sivioli S., Genova C., Lemoli R.M., Marcenaro E. Harnessing NK cells for cancer treatment. *Front. Immunol.*, 2019, Vol. 10, 2836. doi: 10.3389/fimmu.2019.02836.

11. Olennikov D.N., Fedorov I.A., Kashchenko N.I., Chirikova N.K., Vennos C. Khellactone derivatives and other phenolics of *Phlojodicarpus sibiricus* (Apiaceae): HPLC-DAD-ESI-QQQ-MS/MS and HPLC-UV profile, and antiobesity potential of dihydrosamidin. *Molecules*, 2019, 24, Vol. 12, 2286. doi:10.3390/molecules24122286.

12. Shevach E.M. CD4⁺CD25⁺ Suppressor T cells: more questions than answers. *Nat. Rev. Immunol.*, 2002, Vol. 2, no. 6, pp. 389-400.

13. Valdman A., Jaraj S.J., Comperat E., Charlotte F., Roupert M., Pisa P., Egevad L. Distribution of Foxp3-, CD4-, and CD8-positive lymphocytic cells in benign and malignant prostate tissue. *APMIS*, 2010, Vol. 118, pp. 360-365.

14. Zha X., Xu Z., Liu Y., Xu L., Huang H., Zhang J., Cui L., Zhou C., Xu D. Amentoflavone enhances osteogenesis of human mesenchymal stem cells through JNK and p38 MAPK pathways. *J. Nat. Med.*, 2016, Vol. 70, pp. 634-644.

15. Zhang H., Liu L., Zhang J., Chen J., Ye J., Shukla S., Qiao J., Zhan X., Chen H., Wu C.J., Fu Y.-X., Li B. Investigation of antigen-specific T-cell receptor clusters in human cancers. *Clin. Cancer Res.*, 2019, Vol. 26, 3249. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-19-3249.

Авторы:

Егоров А.Н. — аспирант Института естественных наук ФГАОУ ВО «Северо-Восточный федеральный университет имени М.К. Аммосова», г. Якутск, Республика Саха (Якутия), Россия

Пашкина Е.А. — к.б.н., заведующая внебюджетной лабораторией регуляции иммунного ответа; доцент кафедры клинической иммунологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Гольдерова А.С. — д.м.н., профессор кафедры «Организация здравоохранения и профилактическая медицина» Медицинского института ФГАОУ ВО «Северо-Восточный федеральный университет имени М.К. Аммосова», г. Якутск, Республика Саха (Якутия), Россия

Authors:

Egorov A.N., Postgraduate Student, M. Ammosov North-Eastern Federal University, Yakutsk, Republic of Sakha (Yakutia), Russian Federation

Pashkina E.A., PhD (Biology), Head, Laboratory of Immune Response Regulation; Associate Professor, Department of Clinical Immunology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Golderova A.S., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Health Organization and Preventive Medicine, M. Ammosov North-Eastern Federal University, Yakutsk, Republic of Sakha (Yakutia), Russian Federation

Поступила 10.07.2023
Принята к печати 12.07.2023

Received 10.07.2023
Accepted 12.07.2023

АКТИВНОСТЬ НОВЫХ ГИБРИДНЫХ СИНТЕТИЧЕСКИХ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ ПЕПТИДОВ CaBuCr И CaLTX *IN VIVO* В МОДЕЛИ АСЦИТНОЙ КАРЦИНОМЫ ЭРЛИХА МЫШИ

Жаркова М.С., Рудель А.Е., Дятлова А.С.

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

Резюме. Катионные амфипатические пептиды системы врожденного иммунитета, способные селективно связываться и повреждать мембраны опухолевых клеток, рассматриваются как перспективные кандидаты для расширения арсенала химиопрепаратов в борьбе с устойчивыми к терапии опухолями. Целью работы являлась оценка противоопухолевой активности новых синтетических гибридных пептидов CaBuCr и CaLTX *in vivo*, для чего использовали модель асцитной карциномы Эрлиха (АКЭ) мышей. Пептиды представляют собой химерные последовательности на основе N-концевого фрагмента (1-8) цекропина А и регуляризованной пролин- и триптофан-богатой последовательности кателицидина 4 азиатского буйвола buCATHL4D (в случае CaBuCr), либо сходной с синтетическим пептидом LTX-315 последовательности с чередованием 2 лизина — 2 триптофана (в случае CaLTX). Ранее данные пептиды продемонстрировали высокую активность в отношении 6 линий опухолевых клеток и низкую гемолитичность в отношении эритроцитов человека *in vitro*. Развитие асцитной опухоли у мышей-самцов F1 CBA × C57BL/6 инициировали интраперитонеальной инъекцией 1 млн клеток АКЭ. Животные получали 10-дневный курс ежедневных инъекций пептидов в дозе 1,3 мг/кг. Анализировали кривые выживаемости, а также, по результатам эвтаназии 3 животных из каждой группы на 11-е сутки, объем асцита, число и концентрацию клеток АКЭ и количество лейкоцитов в крови. Группой сравнения выступали животные, получавшие инъекции физраствора. Оба пептида снижали общее количество клеток в асците более чем на 40% и существенно повышали концентрацию лейкоцитов в крови. Эффект CaBuCr на сроки жизни животных с опухолью оказался более выражен, среднее время жизни повышалось на 24% относительно контрольной группы, тогда как для CaLTX прирост составил всего 13%. Сравнение с ранее исследовавшимся в модели АКЭ цитолитическим пептидом протегрином 1 позволяет предположить вклад не только прямых цитотоксических, но и иммуномодулирующих эффектов в наблюдаемую картину действия рассматриваемых пептидов.

Ключевые слова: антимикробные пептиды, противоопухолевая активность, асцит, карцинома Эрлиха, кривые выживаемости, мыши

Адрес для переписки:

Жаркова Мария Сергеевна
ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»
197022, Россия, Санкт-Петербург, ул. Академика
Павлова, 12.
Тел.: 8 (812) 234-07-64.
E-mail: zharkova.ms@yandex.ru

Address for correspondence:

Maria S. Zharkova
Institute of Experimental Medicine
12 Acad. Pavlov St
St. Petersburg
197022 Russian Federation
Phone: +7 (812) 234-07-64.
E-mail: zharkova.ms@yandex.ru

Образец цитирования:

М.С. Жаркова, А.Е. Рудель, А.С. Дятлова «Активность новых гибридных синтетических противоопухолевых пептидов CaBuCr и CaLTX *in vivo* в модели асцитной карциномы Эрлиха мыши» // Российский иммунологический журнал, 2025. Т. 28, № 3. С. 515-520. doi: 10.46235/1028-7221-17195-IVA

© Жаркова М.С. и соавт., 2025
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

M.S. Zharkova, A.E. Rudel, A.S. Diatlova "In vivo activity of novel hybrid synthetic antitumor peptides CaBuCr and CaLTX in murine model of Ehrlich ascites carcinoma", Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2025, Vol. 28, no. 3, pp. 515-520. doi: 10.46235/1028-7221-17195-IVA

© Zharkova M.S. et al., 2025
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.46235/1028-7221-17195-IVA

IN VIVO ACTIVITY OF NOVEL HYBRID SYNTHETIC ANTITUMOR PEPTIDES CaBuCr AND CaLTX IN MURINE MODEL OF EHRlich ASCITES CARCINOMA

Zharkova M.S., Rudel A.E., Diatlova A.S.

Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. Cationic amphipathic peptides of the innate immune system that are able to selectively bind to and damage cancer cell membranes are considered promising candidates for extending the pipeline of chemotherapeutics in order to combat drug-resistant malignancies. The current research was aimed at evaluating antitumor activity of novel synthetic hybrid peptides CaBuCr and CaLTX *in vivo*, using a murine Ehrlich ascites carcinoma (EAC) model. These peptides are chimeric sequences based on the N-terminal fragment (1-8) of cecropin A combined with the regularized proline- and tryptophan-rich sequence of water buffalo's cathelicidin 4 buCATHL4D (abbrev. name CaBuCr), or with a sequence based on 2 lysine – 2 tryptophan repeats similar to that of the synthetic peptide LTX-315 (abbrev. name CaLTX). These peptides were found to be highly active against 6 tumor cell lines and demonstrated low hemolytic activity towards human erythrocytes *in vitro*. The ascites tumors were initiated in male F1 CBA × C57BL/6 mice by intraperitoneal injection of 1 million EAC cells. The animals were injected with tested peptides at a dose of 1.3 mg/kg daily for 10 days. We analyzed survival curves, as well as a number of estimated parameters based on sacrificing 3 animals from each group on the 11th day since the tumor inoculation, i.e., volume of ascite tumors, total number and concentration of EAC cells, and leukocyte counts in murine blood. The experimental results were compared to the control mice that received injections of physiological saline. Both peptides showed the ability of reducing total number of ascites cells by > 40% and significantly increased the leukocyte counts in peripheral blood. CaBuCr demonstrated a more pronounced effect on the lifespan of tumor-bearing mice: the average survival time increased by 24% compared with control group, whereas CaLTX was able to provide only an increase of 13%. Comparison with cytolytic peptide protegrin 1, being previously studied in EAC model, suggests that besides direct cytotoxic action, immunomodulatory effects may also contribute to observed *in vivo* activity of the peptides of interest.

Keywords: antimicrobial peptides, antitumor activity, ascites, Ehrlich carcinoma, survival curves, mice

Исследование проведено в рамках темы государственного задания FGWG-2025-0024.

Введение

Некоторые эффекторные пептиды системы врожденного иммунитета, также известные как катионные антимикробные пептиды (АМП), способны избирательно распознавать и нарушать структуру мембран не только бактерий, но и опухолевых клеток за счет повышенного содержания в них электроотрицательных компонентов (фосфатидилсерина, сialiрированных гликолипидов и гликопротеинов и др.), большей площади поверхности и, зачастую, сниженного содержания холестерина [6]. Поскольку в противовес большинству применяемых химиопрепаратов принцип действия таких пептидов напрямую не связан с темпами деления клетки, они рассматриваются как перспективные кандидаты для пополнения арсенала противоопухолевых агентов, потенциально эффективные против обладающих лекарственной устойчивостью клеток, например присутствующих в опухоли персистирующих клеток с низкой метаболической активностью [2,

6]. Ранее нами был синтезирован набор гибридных противоопухолевых АМП на основе богатых пролином, триптофаном или лейцином последовательностей. По результатам тестирования *in vitro* в отношении 6 линий опухолевых и 2 типов нетрансформированных клеток среди них было выделено несколько перспективных пептидов-прототипов по сочетанию высокой активности и селективности цитотоксического действия против опухолевых клеток, а также низкой гемолизности. Наибольший интерес представляли пептиды на основе N-концевого фрагмента (1-8) АМП цекропина А CaBuCr и CaLTX. В случае CaBuCr C-концевая часть была представлена регуляризованной пролин- и триптофан-богатой последовательностью кателицидина 4 азиатского буйвола buCATHL4D с частичной заменой остатков аргинина остатками лизина. В случае CaLTX использовали последовательность с повторами 2 лизина через 2 триптофана, сходную с последовательностью известного противоопухолевого синтетического пептида LTX-315 за исключением замены непротеиногенной аминокислоты остатком триптофана. Основным отличием между

пептидами, по данным *in vitro*, был индекс селективности действия против опухолевых клеток в сравнении с нормальными, который для CaBuCr более чем в 2 раза превышал аналогичный показатель CaLTx.

Целью текущего исследования была проверка противоопухолевых свойств данных синтетических гибридных пептидов в условиях *in vivo* против экспериментально индуцированной опухоли у животных, в качестве которой была выбрана модель асцитной карциномы Эрлиха (АКЭ) мыши.

Материалы и методы

Пептиды были получены методом твердофазного химического синтеза в автоматическом режиме с использованием пептидного синтезатора Symphony X (Protein Technologies inc, США) с инфракрасным нагревом до 70 °С на этапе конденсации. Применяли стандартную схему с Fmoc/tBu защитами; использовали Fmoc-защищенные аминокислоты производства Iris Biotech GmbH, Германия; в качестве полимера-носителя выступала 2-хлортритил хлоридная смола.

Анализ и очистку синтезированных аминокислотных последовательностей осуществляли методом обратно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ-ВЭЖХ) с использованием хроматографической системы NGC Chromatography System Quest 10 Plus (Bio-Rad, США). При препаративной ОФ-ВЭЖХ разделение проводили на колонке Waters Symmetry (C-18, 19 × 300 мм, 7 мкм, Waters Corp, США), элюирование происходило в градиенте 5 → 70% вода → ацетонитрил в присутствии 0,1% трифторуксусной кислоты (ТФУ) за 60 минут. При аналитической ОФ-ВЭЖХ использовали колонку Luna (C-18, 4,6 × 250 мм, 5 мкм, Phenomenex, США) и элюировали пептиды в градиенте 5 → 60% вода → ацетонитрил в присутствии 0,1% ТФУ за 15 минут. Соответствие расчетной молекулярной массе подтверждали методом времяпролетной масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI TOF) на приборе MALDI TOF Ultraflex (Bruker, США). Чистота препаратов составила 95% для CaBuCr и 99% для CaLTx.

Цитотоксическую активность пептидов в отношении клеток АКЭ мыши предварительно оценивали в условиях *in vitro* в классическом МТТ-тесте [7]. Культуру карциномы Эрлиха поддерживали переносом 5 млн клеток, полученных из асцитной жидкости животного с опухолью, следующему животному каждые 10 дней. Клетки вводили интраперитонеально в 0,4 мл забуференного физиологического раствора (ЗФР). Для экспериментов клетки дважды отмывали в стерильном ЗФР: осаждали 10-минутным цен-

трифугированием при 300 г и 4 °С и освобождали от супернатанта. В случае МТТ-теста клетки ресуспендировали в среде RPMI-1640 (Биолот, Россия) и распределяли по 30 тыс. в лунки тестового 96-луночного планшета для суспензионных культур, куда затем вносили двукратные серийные разведения пептидов в 3 повторностях. Данные о проценте клеточной гибели в пробах в сравнении с контролем интактных клеток аппроксимировали стандартной S-образной кривой с 4 параметрами и вычисляли 50% ингибирующие концентрации (ИК₅₀) с использованием программного пакета SigmaPlot 11.0.

Для моделирования опухолевого процесса *in vivo* использовали самцов мышей гибридов 1-го поколения CBA × C57BL/6 в возрасте 3-4 мес, средней массой 23±2 г, из питомника «Рапполово» (Санкт-Петербург, Россия). Развитие опухоли инициировали интраперитонеальной инъекцией 1 млн клеток АКЭ в 0,4 мл ЗФР в 0-й день эксперимента. Ежедневно, с 1-го до 10-го дня, животным также интраперитонеально вводили по 30 мкг пептидов (1,3 мг/кг в пересчете на вес) в 0,1 мл ЗФР; контрольной группе вводили 0,1 мл ЗФР без пептидов. Экспериментальные и контрольная группы насчитывали по 13 животных. В 0-й, 6-й и 11-й день проводили контрольные взвешивания. На 11-й день 3 мышей из каждой группы подвергали эвтаназии и лапаротомии, тщательно отбирали всю асцитную жидкость, измеряли ее объем, подсчитывали в камере Горяева концентрацию клеток АКЭ в образцах. Перед эвтаназией проводили также забор крови из кончика хвоста для определения количества лейкоцитов: 10 мкл цельной крови добавляли к 190 мкл раствора 5% уксусной кислоты, подкрашенного метиленовым синим. Смесь перемешивали и наносили образец на камеру Горяева. Подсчет проводили в 100 больших квадратах. По данным наблюдений за оставшимися 10-ю животными каждой группы строили кривые выживаемости Каплана—Мейера.

Животные содержались на стандартном рационе со светотемновым циклом 12:12 ч, температурой 23±2 °С и доступом к еде и воде *ad libitum* в условиях вивария. Работы проводились в соответствии с ГОСТ 33215-2014 и 33216-2014 и Сан-Пин 2.2.1.3218—14, регламентирующими правила обращения с лабораторными животными, и положениями «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях». Экспериментальные процедуры осуществляли согласно протоколу 1/20 от 27.02.2020, утвержденному локальным этическим комитетом ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины».

Сравнение экспериментальных групп с контрольной по численным параметрам проводили с

использованием U-критерия Манна–Уитни; при сравнении данных выживаемости использовали логарифмический ранговый тест.

Результаты и обсуждение

Было выявлено, что в условиях *in vitro* оба рассматриваемых синтетических гибридных пептида оказывают выраженное цитолитическое действие на клетки АКЭ, сравнимое с эффектом высокоактивного мембранолитического β -спилечного АМП свиньи протегрин 1. По результатам трех независимых экспериментов ИК₅₀ CaLTX составила $2,6 \pm 0,3$ мкМ, а ИК₅₀ CaBuCr — $2,9 \pm 0,4$ мкМ, что статистически не отличается от ранее опубликованной ИК₅₀ протегрин 1, равной $2,9 \pm 0,3$ мкМ [1]. При этом прямая цитотоксическая активность данных линейных пептидов, обогащенных триптофаном в случае CaLTX или триптофаном и пролином в случае CaBuCr, более выражена, чем у обогащенного пролином линейного пептида бактенецина ChBac3.4 (ИК₅₀ $13,3 \pm 0,2$ мкМ [1]), для которого была показана противоопухолевая активность против солидной карциномы Эрлиха *in vivo* [4].

У мышей с асцитной опухолью, индуцированной введением клеток АКЭ, 10-дневный курс ежедневных интраперитонеальных инъекций как CaBuCr, так и CaLTX положительно сказывался на продолжительности жизни (рис. 1). В сравнении с контрольной группой, где средняя продолжительность жизни животных с опухолью составила $19,8 \pm 2,5$ суток (медиана 20,5 суток), в группе, получавшей CaBuCr, данный показатель увеличился на 24,2% и был равен $24,6 \pm 4,6$ суток (медиана 25 суток). CaLTX показал несколько меньшие результаты: продолжительность жизни мышей, получавших данный пептид, со дня индукции опухоли составляла $22,4 \pm 2,8$ суток (медиана 22,5 суток), на 13,1% больше, чем у контрольных. Исследование животных, выведенных из эксперимента по окончании курса введения пептидов, показало, что к 11-му дню в контрольной группе объем асцитной жидкости у животных достигал $7,0 \pm 0,5$ мл, общее число клеток в асците — $2,3 \pm 0,1$ млрд, а их концентрация составляла $(3,3 \pm 0,2) \times 10^8$ клеток/мл (рис. 1). Введение CaLTX значимо снижало объем асцита до $5,7 \pm 0,6$ мл (на $19 \pm 9\%$), концентрацию клеток до $(2,3 \pm 0,4) \times 10^8$ клеток/мл (на $30 \pm 13\%$) и их общее число до $1,3 \pm 0,3$ млрд (на $43 \pm 12\%$). Введение CaBuCr существенно не сказывалось на объеме асцита ($6,9 \pm 1,1$ мл), но более выражено снижало концентрацию клеток ($(1,8 \pm 0,1) \times 10^8$ клеток/мл, на $46 \pm 4\%$ меньше, чем в контроле), так что в конечном итоге эффект на общее число клеток был практически аналогичен действию второго пептида: в группе, получавшей CaBuCr, оно состави-

ло $1,2 \pm 0,2$ млрд клеток (на $47 \pm 7\%$ меньше, чем в контроле). Кроме того, в крови мышей экспериментальных групп заметно повышалось количество лейкоцитов: при введении CaBuCr данный показатель составил $(7,1 \pm 0,2) \times 10^6$ клеток/мл, при введении CaLTX — $(8,4 \pm 0,8) \times 10^6$ клеток/мл, а в контрольной группе всего $(4,6 \pm 0,5) \times 10^6$ клеток/мл (рис. 1). В то же время ни CaBuCr, ни CaLTX не оказывали статистически значимого влияния на динамику набора веса животными (рис. 1).

Известно, что пептид цекропинХJ при такой же схеме введения в дозе 5 мг/кг (115 мкг в пересчете на мышь весом 23 г) в модели гетерологичного асцита, вызванного введением мышам линии BALB/C клеток рака желудка человека BGC823, способствовал снижению объема асцита в 2 раза и повышению продолжительности жизни животных на 66% в сравнении с контрольной группой, получавшей 5 мг/кг бычьего сывороточного альбумина [8]. N-концевой участок цекропинаХJ гомологичен использованному при конструировании гибридных пептидов N-концевому фрагменту цекропина А (1–8) за исключением отсутствия первого лизина и замены в положении 4 лейцина изолейцином. С учетом отличий дозировки и характера опухоли можно считать эффекты новых синтетических химерных пептидов сходными с эффектом цекропина ХJ. В то же время при исследовании действия протегрин 1 в модели АКЭ, аналогичной использованной в текущем исследовании, интраперитонеальное введение пептида в дозах от 20 до 80 мкг (от 0,8 до 3,2 мг/кг) на 1-й, 3-й и 5-й день после инокуляции опухоли (в 0-й день) приводило к более чем 50% снижению числа клеток в асците к 10-м суткам, однако никак не влияло на продолжительность жизни животных [1]. Подобную разницу в эффектах можно отчасти отнести к меньшей частоте введения протегрин 1, поскольку пептидные препараты высоко подвержены протеолитической деградации в организме, хотя β -спилечные пептиды в целом более устойчивы к действию протеаз, чем линейные. Однако более редкое и непродолжительное введение протегрин 1 влияет на общую численность клеток АКЭ более выражено, чем десятидневный курс CaBuCr или CaLTX. При этом, на фоне схожести эффекта на численность клеток АКЭ к 10–11 суткам и цитотоксической активности *in vitro* всех трех пептидов, в случае протегрин 1 не наблюдается увеличения продолжительности жизни животных *in vivo*. Это заставляет предположить, что важным в реализации противоопухолевых свойств пептидов является не только непосредственное цитотоксическое воздействие на клетки опухоли, но и сопутствующие реакции иммунной си-

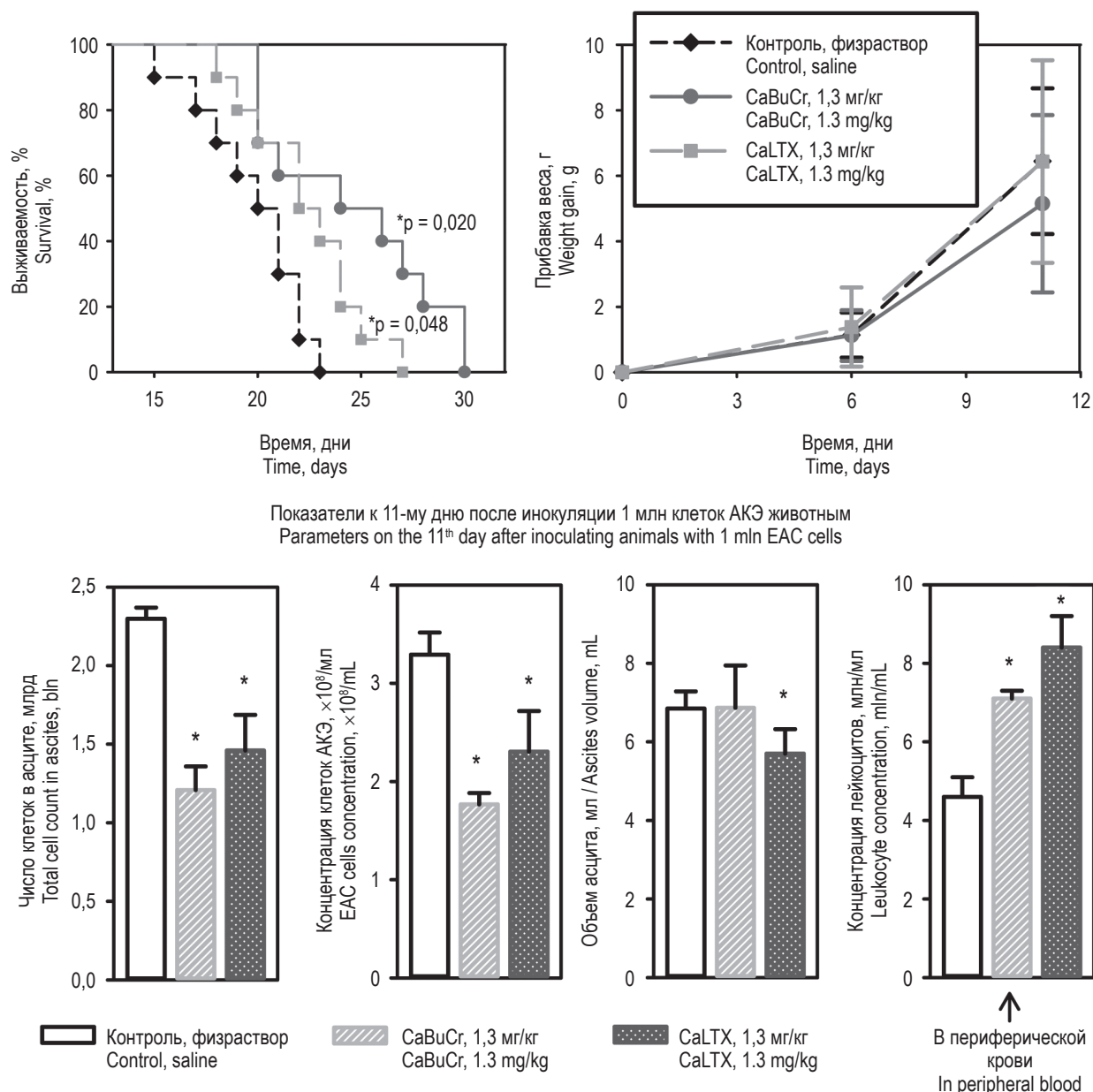


Рисунок 1. Эффекты гибридных пептидов CaBuCr и CaLTX в модели асцитной карциномы Эрлиха мыши

Примечание. * – статистически значимое отличие от контрольной группы; $p = 0,05$, если не указано иное.

Figure 1. Effects of hybrid peptides CaBuCr and CaLTX in the murine Ehrlich ascites carcinoma model

Note. *, statistically significant difference from the control group; $p = 0.05$ unless otherwise specified.

стемы, которые также могут зависеть от частоты введения пептида. Известно, что действие цитолитических пептидов сопровождается высвобождением ассоциированных с повреждением молекулярных паттернов (DAMP), или аларминов, из опухолевых клеток, что приводит к активации противоопухолевого клеточного иммунитета [5]. Отражением данного механизма может быть, в частности, наблюдаемое повышение содержания лейкоцитов в крови животных, получавших пептиды. Кроме того, для некоторых пептидов, например синтетического пептида LTX-315 [5] или β -дефенсина человека hBD3 [3], показаны

прямые модулирующие эффекты на дендритные клетки. В связи с этим различия в выраженности влияния CaBuCr и CaLTX на продолжительность жизни мышей с АКЭ могут быть связаны не только с предположительно меньшей, по данным *in vitro*, избирательностью действия CaLTX в отношении именно опухолевых клеток, но и с индивидуальными особенностями иммуномодулирующих свойств данных пептидов.

Закключение

Таким образом, оба новых гибридных пептида, CaBuCr и CaLTX, проявляют противоопухо-

левую активность *in vivo* против модельной АКЭ у мышей: снижают численность клеток опухоли и увеличивают продолжительность жизни животных — и являются перспективными для продолжения разработки противоопухолевых комбинаций на их основе. При этом, несмотря на сходство эффектов пептидов в отношении клеток АКЭ в культуре, *in vivo* действие CaBuCr более выражено, что указывает на влияние дополнительных факторов, помимо прямой цитотоксичности.

В целом следует отметить, что увеличение срока выживаемости при повышении длительности

курса и частоты введения, наблюдаемое в сравнении с предыдущими экспериментами с пептидом PG-1 в той же модели, подкрепляет идею о том, что модификации для повышения протеолитической стабильности способны усилить противоопухолевый потенциал пептидов *in vivo*. В то же время необходимо учесть и подробно изучить иммуномодулирующие возможности противоопухолевых АМП: как с целью лучшего понимания механизма реализации их свойств, так и для осуществления удачной модификации, например, при использовании D-аминокислот.

Список литературы / References

1. Рудель А.Е., Филатенкова Т.А., Жаркова М.С. Активность протеогрина-1 в отношении асцитной карциномы Эрлиха мыши *in vitro* и *in vivo* // Медицинский академический журнал, 2024. Т. 24, № 2. С. 117-124. [Rudel A.E., Filatenkova T.A., Zharkova M.S. Activity of protegrin-1 against mouse Ehrlich ascites carcinoma *in vitro* and *in vivo*. *Meditsinskiy akademicheskii zhurnal = Medical Academic Journal*, 2024, Vol. 24, no. 2, pp. 117-124. (In Russ.)]
2. Dhanyamraju P.K., Schell T.D., Amin S., Robertson G.P. Drug-tolerant persister cells in cancer therapy resistance. *Cancer Res.*, 2022., Vol. 82, no. 14, pp. 2503-2514.
3. Ferris L.K., Mburu Y.K., Mathers A.R., Fluharty E.R., Larregina A.T., Ferris R.L., Falo L.D., Jr. Human beta-defensin 3 induces maturation of human Langerhans cell-like dendritic cells: An antimicrobial peptide that functions as an endogenous adjuvant. *J. Investig. Dermatol.*, 2013, Vol. 133, no. 2, pp. 460-468.
4. Kopeikin P.M., Zharkova M.S., Kolobov A.A., Smirnova M.P., Sukhareva M.S., Umnyakova E.S., Kokryakov V.N., Orlov D.S., Milman B.L., Balandin S.V., Panteleev P.V., Ovchinnikova T.V., Komlev A.S., Tossi A., Shamova O.V. Caprine Bactenecins as Promising Tools for Developing New Antimicrobial and Antitumor Drugs. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 2020, Vol. 10, 552905. doi: 10.3389/fcimb.2020.552905.
5. Li X.Q., Yamazaki T., He T., Alam M.M., Liu J., Trivett A.L., Sveinbjørnsson B., Rekdal Ø., Galluzzi L., Oppenheim J.J., Yang D. LTX-315 triggers anticancer immunity by inducing MyD88-dependent maturation of dendritic cells. *Front. Immunol.*, 2024, Vol. 15, 1332922. doi: 10.3389/fimmu.2024.1332922.
6. Lin L., Chi J., Yan Y., Luo R., Feng X., Zheng Y., Xian D., Li X., Quan G., Liu D., Wu C., Lu C., Pan X. Membrane-disruptive peptides/peptidomimetics-based therapeutics: Promising systems to combat bacteria and cancer in the drug-resistant era. *Acta Pharm. Sin. B.*, 2021, Vol. 11, no. 9, pp. 2609-2644.
7. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*, 1983, Vol. 65, no. 1-2, pp. 55-63.
8. Xia L.J., Wu Y.L., Ma J., Zhang F.C. Therapeutic effects of antimicrobial peptide on malignant ascites in a mouse model. *Mol. Med. Rep.*, 2018, Vol. 17, no. 5, pp. 6245-6252.

Авторы:

Жаркова М.С. — к.б.н., заведующая лабораторией противоопухолевых пептидных препаратов ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Рудель А.Е. — младший научный сотрудник лаборатории противоопухолевых пептидных препаратов ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Дятлова А.С. — научный сотрудник лаборатории противоопухолевых пептидных препаратов ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Authors:

Zharkova M.S., PhD (Biology), Head, Laboratory of Anticancer Peptide Drugs, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Rudel A.E., Junior Researcher, Laboratory of Anticancer Peptide Drugs, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Diatlova A.S., Researcher, Laboratory of Anticancer Peptide Drugs, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Поступила 30.03.2025
Принята к печати 25.05.2025

Received 30.03.2025
Accepted 25.05.2025

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ИММУНОМОДУЛИРУЮЩЕГО ВЛИЯНИЯ ЭКСТРАКТА ИЗ ГОЛОТУРИЙ И ИНДУКТОРОВ ПОЛЯРИЗАЦИИ МАКРОФАГОВ НА МОДЕЛИ ФАГОЦИТОВ *EUPENTACTA FRAUDATRIX* ПРИ РАНЕНИИ

Долматова Л.С.

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

Резюме. Голотурии известны своей высокой способностью к регенерации. Экстракт (ЭГ) из тканей дальневосточных видов голотурий способен ускорять заживление ран. У позвоночных животных в регуляции заживления участвуют два типа макрофагов с различной ролью на разных стадиях заживления. У голотурий также выделяются две обогащенные фракции фагоцитов, являющихся аналогами макрофагов, Ф1 и Ф2. Механизмы влияния ЭГ на отдельные типы фагоцитов в процессе ранозаживления в модельных экспериментах оставались неисследованными. Представляло интерес исследование влияния ЭГ в сравнении с препаратами, известными как индукторы поляризации макрофагов. Целью данной работы явилось изучение влияния ЭГ на численность и фенотип фагоцитов Ф1 и Ф2 при ранении голотурии *Eupentacta fraudatrix* в сравнении с таковым гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF) и фактора некроза опухолей α (TNF α). Экспериментальным животным (n = 4-6) скальпелем наносили поверхностную рану. Части животных дополнительно инъецировали препараты: GM-CSF, TNF α или ЭГ. Через 0 мин и 1 сут. фагоциты Ф1 и Ф2 выделяли центрифугированием целомической жидкости в градиенте плотности фиколловорографина. Определяли концентрацию целоцитов и содержание фагоцитов Ф1 и Ф2 методами световой микроскопии. Оценку связывания клеток ФИТЦ-мечеными лектинами из *Dolichos biflorus* (DBA), *Canavalia ensiformis* (conA) и *Glycine max* (SBA) проводили с использованием флуоресцентного микроскопа. Измерение длины раны проводили через 0 мин и 72 ч. Поверхностное повреждение тела голотурии вызывало через 24 ч возрастание концентрации целоцитов и содержания фагоцитов Ф1, но снижение содержания Ф2-фагоцитов. Изменения в численности клеток целомической жидкости у раненых животных и снижение их дифференциации, о котором судили по связыванию

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) 231-25-80.
Факс: 8 (423) 231-25-73.
E-mail: dolmatova@poi.dvo.ru

Address for correspondence:

Lyudmila S. Dolmatova
V.I. Il'ichev Pacific Oceanological Institute, Far Eastern
Branch, Russian Academy of Sciences
43 Baltiyskaya St
Vladivostok
690041 Russian Federation
Phone: +7 (423) 231-25-80.
Fax: +7 (423) 231-25-73.
E-mail: dolmatova@poi.dvo.ru

Образец цитирования:

Л.С. Долматова «Сравнительное исследование
иммуномодулирующего влияния экстракта
из голотурий и индукторов поляризации макрофагов
на модели фагоцитов *Eupentacta fraudatrix* при ранении»
// Российский иммунологический журнал, 2025. Т. 28,
№ 3. С. 521-528.
doi: 10.46235/1028-7221-17207-COI
© Долматова Л.С., 2025
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

L.S. Dolmatova "Comparison of immunomodulatory effects
induced by holothurian extract and macrophage polarization
drivers using model of phagocytes of injured *Eupentacta
fraudatrix*", Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy
Immunologicheskii Zhurnal, 2025, Vol. 28, no. 3, pp. 521-528.
doi: 10.46235/1028-7221-17207-COI
© Dolmatova L.S., 2025
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.46235/1028-7221-17207-COI

лектина DBA, при воздействии препаратов свидетельствуют о том, что цитокины, по-видимому, вызвали сдвиг соотношения фагоцитов двух типов в тканях в сторону преобладания $\Phi 1$ -фагоцитов, а ЭГ — $\Phi 2$ -фагоцитов. Оценка связывания клетками *conA* выявила, что цитокины подавляли функциональную активность $\Phi 1$ -фагоцитов при ранении. ЭГ не только подавлял функциональную активность $\Phi 1$ -фагоцитов, но и стимулировал активность $\Phi 2$ -фагоцитов, при этом ускорял заживление раны по сравнению с цитокинами. Ускорение заживления раны при воздействии ЭГ связано с преимущественной активацией $\Phi 2$ -фагоцитов и их рекрутированием в ткани. Это свидетельствует о важной роли $\Phi 2$ -фагоцитов в восстановлении тканей.

Ключевые слова: голотурии, фагоциты, гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор, *TNF α* , экстракт из голотурий, ранозаживление

COMPARISON OF IMMUNOMODULATORY EFFECTS INDUCED BY HOLOTHURIAN EXTRACT AND MACROPHAGE POLARIZATION DRIVERS USING MODEL OF PHAGOCYTES OF INJURED *EUPENTACTA FRAUDATRIX*

Dolmatova L.S.

V.I. Il'ichev Pacific Oceanological Institute, Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences, Vladivostok, Russian Federation

Abstract. Holothurians (sea cucumbers) are known for their high regenerative ability. Extract from Far-Eastern holothurian tissues (EH) is able to accelerate wound healing. In vertebrates, two types of macrophages display different roles in regulation of healing at its different stages. In holothurians, two enriched fractions of phagocytes (P1 and P2) are also identified being the analogues to macrophages. The mechanisms of EH influence on separate types of phagocytes in the wound healing remains unexplored. It was of interest to study the effect of EH in model experiments, in comparison with substances known as inducers of macrophage polarization. The aim of this work was to study the effect of EH on the number and phenotype of phagocytes P1 and P2 in the wounded holothurian *Eupentacta fraudatrix* in comparison with efficiency of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and tumor necrosis factor α (TNF α). The experimental animals ($n = 4$ to 6) received a superficial wound with a lancet. Some animals were additionally injected with GM-CSF, TNF α or EH. After 0 min and 1 day phagocytes P1 and P2 were isolated by centrifugation of coelomic fluid in a density gradient of Ficoll-Verographin. The concentration of coelomocytes and content of phagocytes P1 and P2 were determined by light microscopy. The binding of cells to FITC-labeled lectins from *Dolichos biflorus* (DBA), *Canavalia ensiformis* (conA) and *Glycine max* (SBA) was assessed using a fluorescence microscope. The wound length was measured at initial time point (0 min.) and 72 h. Surface damage of the holothurian body caused an increase in concentration of coelomocytes and contents of P1 phagocytes, but decreased the number of P2 phagocytes. Changed cell numbers in coelomic fluid of wounded animals and decrease in their differentiation, assessed by DBA lectin binding upon exposure to the test substances indicate that the cytokines apparently caused a shift in the ratio of tissue phagocytes in favor of P1 phagocytes, while EH promoted P2 phagocytic population. Evaluation of ConA cell binding revealed that cytokines suppressed the functional activity of P1 phagocytes upon wound injury. EH did not only suppress the functional activity of P1 phagocytes, but also stimulated the activity of P2 phagocytes, and promoted wound healing, as compared to cytokines. Acceleration of wound healing under the influence of EH is associated with preferential activation of P2 phagocytes and their recruitment into tissues. This finding suggests an important role of P2 phagocytes in tissue repair.

Keywords: sea cucumbers, phagocytes, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, TNF α , sea cucumber extract, wound healing

Работа выполнена в рамках госзадания Министерства науки и высшего образования РФ № 121021500052-9.

Введение

Морские беспозвоночные животные голотурии (*Holothuroidea*, *Echinodermata*) известны своей высокой способностью к регенерации утраченных частей тела и эффективному заживлению ран [5]. Ранее полученный из тканей голотурий дальневосточных видов экстракт (ЭГ) обладает выраженными бактерио- и фунгистатическими эффектами, а также способствует ускорению заживления ран [1]. Отмечены его иммуномодулирующие свойства на модели фагоцитов голотурий, являющихся аналогами макрофагов, *in vitro* [2]. В исследованиях на позвоночных животных установлена ведущая роль отдельных типов макрофагов (M1 или M2) в регуляции заживления на его разных стадиях [15]. M1- и M2-макрофаги имеют ряд фенотипических отличий, в частности M1-макрофаги несут поверхностные маркеры CD64 и CD80, а M2-макрофаги характеризуются наличием CD64 и CD209. Кроме того, в макрофагах M1 высок уровень продукции оксида азота (NO), а M2-клетки отличается высокая активность аргиназы. Макрофаги принимают тот или иной фенотип («поляризуются») под влиянием микроокружения. Для стимуляции их поляризации по M1-пути могут использоваться некоторые препараты. Такие цитокины, как гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF) и фактор некроза опухолей α (TNF α) считаются индукторами поляризации по M1-типу [9]. В то же время есть данные о способности этих цитокинов стимулировать заживление ран [3].

Участие фагоцитов голотурий в заживлении ран было продемонстрировано ранее [13]. Вместе с тем, выделение обогащенных фракций фагоцитов, получивших название Ф1 и Ф2, которые имеют высокий уровень NO или высокую активность аргиназы соответственно [8], позволяет выделить среди фагоцитов голотурий две субпопуляции, подобные M1- и M2-макрофагам.

Было также показано, что количество Ф1- и Ф2-фагоцитов и их соотношение меняются в процессе заживления раны, что позволило предположить их различную роль [7]. Одним из факторов, затрудняющих дальнейшие исследования, является отсутствие у фагоцитов голотурий поверхностных маркеров, известных для позвоночных. Однако Ф1- и Ф2-фагоциты голотурий отличаются по уровню связывания их поверхностных рецепторов с растительными лектина-

ми [6], что позволяет характеризовать различия в их фенотипе.

Механизмы влияния ЭГ на отдельные типы фагоцитов в процессе ранозаживления в модельных экспериментах оставались неизученными. Представляло интерес исследование влияния экстракта в сравнении с препаратами, известными как индукторы поляризации макрофагов.

Целью данной работы явилось изучение влияния ЭГ на численность и фенотип фагоцитов Ф1 и Ф2 при поверхностном ранении голотурии *Eupentacta fraudatrix* в сравнении с таковым GM-CSF и TNF α .

Материалы и методы

Экземпляры голотурии *E. fraudatrix* с длиной тела 4–6 см собирали в феврале-марте в зал. Восток (зал. Петра Великого, Японское море) легко-водолазным методом. ЭГ получали из тканей голотурий, собранных в б. Алексеева (зал. Петра Великого, Японское море), на МЭС ТОИ ДВО РАН «о. Попова», по методу, описанному ранее [1].

Поверхностный надрез производили скальпелем. Одновременно животным ($n = 4-6$) с помощью шприца вводили в целомическую полость фосфатно-солевой буфер с добавлением 36 г/л NaCl (ФСБН) или один или два препарата: GM-CSF (0,02 мкг/г, ГНЦ ИБХ РАН, Россия), TNF α (0,02 мкг/г, «Цитокин», Россия) и ЭГ (0,3 мкг/г). Кроме того, интактным животным инъецировали ФСБН (контроль) или другие препараты. Через 0 мин или 24 ч от начала эксперимента у животных отбирали целомическую жидкость (ЦЖ), из которой выделяли фагоциты двух типов центрифугированием в градиенте фиколла-верографина [6]. Определяли концентрацию клеток в камере Горяева. Окрашивание клеток ФИТЦ-мечеными лектинами (ICN Biomedicals, Eschwege, Germany) из *Dolichos biflorus* (DBA), *Canavalia ensiformis* (conA) и *Glycin max* (SBA), проводили по методу, описанному McKenzie, Preston [11]. Исследование флуоресценции конъюгатов проводили с использованием микроскопа Leica DM 4500 (Wetzlar, Германия). Измерение длины раны проводили немедленно и через 72 ч после нанесения раны. Различия между группами определяли методом одновариантного анализа (one-way ANOVA) с использованием t-критерия Стьюдента. Разницу между группами считали достоверной при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Ранение вызывало увеличение концентрации клеток в целомической жидкости через 1 сут. в 4,8 раза по сравнению с контролем (рис. 1А). По-

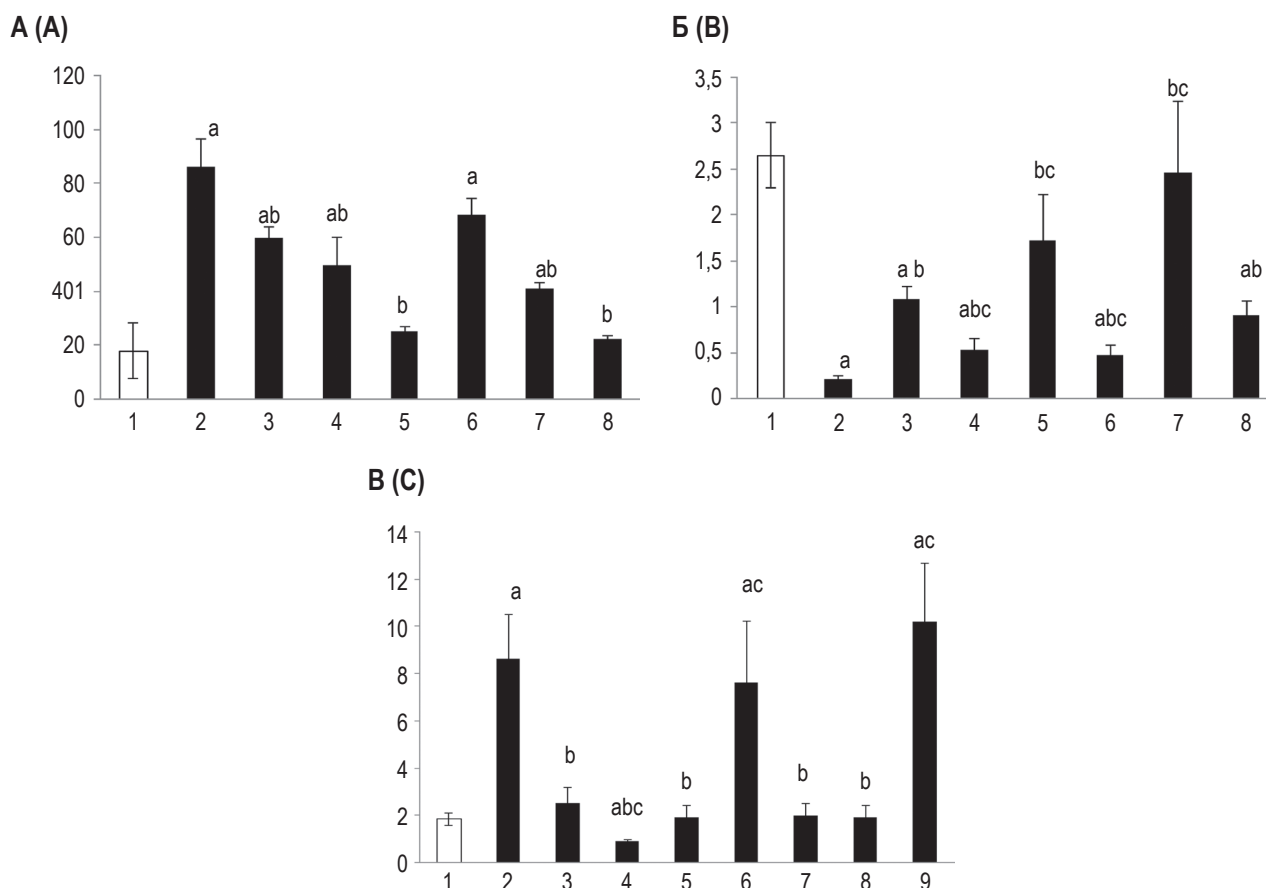


Рисунок 1. Концентрация клеток целомиической жидкости при ранении и инъекции препаратов, $M \pm \Sigma$

Примечание. А – целомоциты, 1 сут. 1 – ФСБН, 2 – ранение + ФСБН, 3 – GM-CSF, 4 – ранение + GM-CSF, 5 – ранение + TNF α , 6 – ЭГ, 7 – ранение + ЭГ, 8 – ранение + ЭГ + GM-CSF. По оси ординат-концентрация клеток, кл. × 10⁶/мл. Достоверность различий между контролем (ФСБН) и ранением (а) и между ранением и другими экспериментальными группами (b) соответствует $p < 0,05$. $n = 6$. Б и В – содержание фагоцитов Ф1 (Б) и Ф2 (В). 1 – ФСБН, 0 мин, 2 – ФСБН 1 сут., 3 – ранение + ФСБН 1 сут., 4 – GM-CSF 1 сут., 5 – ранение+GM-CSF 1 сут., 6 – ранение + TNF α , 1 сут., 7 – ранение + ЭГ 1 сут., 8 – ранение + ЭГ + GM-CSF 1 сут., 9 – ЭГ, 1 сут. По оси ординат-количество фагоцитов, кл. × 10⁶/экземпляр. Достоверность различий между контролем на 0 мин и группами на 1 сут. (а) и между контролем на 1 сут. и экспериментальными группами на 1 сут. (b), а также между ранением и другими экспериментальными группами (c) соответствует $p < 0,05$. $n = 6$.

Figure 1. Concentration of coelomic fluid cells during injury and drug injection, $M \pm \Sigma$

Note. A, coelomocytes, 1 day. 1, buffered saline, BSN; 2, injury + BSN; 3, GM-CSF; 4, injury + GM-CSF; 5, injury + TNF α ; 6, EH; 7, injury + EH; 8, injury + EH + GM-CSF. The ordinate axis shows cell concentration, cells × 10⁶/mL. Note: the significance of differences between the control (BSN) and wound (a) and between wound and other experimental groups (b) corresponds to $p < 0.05$. $n = 6$. (B) and (C): Content of phagocytes P1 (B) and P2 (C). 1, BSN; 0 min; 2, BSN 1 day; 3, wound + BSN 1 day; 4, GM-CSF 1 day; 5, wound + GM-CSF 1 day; 6, wound + TNF α , 1 day; 7, wound + EH 1 day; 8, wound + EH + GM-CSF 1 day; 9, EH, 1 day. The ordinate axis shows the number of phagocytes, cells × 10⁶/specimen. Note: the significance of differences between the control at 0 min and the groups on day 1 (a) and between the control on day 1 and the experimental groups on day 1 (b), as well as between injury and other experimental groups (c) corresponds to $p < 0.05$. $n = 6$.

вышение уровня циркулирующих целомоцитов через 1 сут. после ранения голотурии было показано и ранее [7]; оно сопровождается падением количества клеток в первые часы после ранения и, по-видимому, связано с необходимостью пополнения пула клеток, рекрутируемых в ткани.

При этом GM-CSF и ЭГ также повышали концентрацию целомоцитов по сравнению с контро-

лем, как у интактных, так и раненых животных, однако это повышение в последнем случае было ниже, чем при одном ранении. Введение TNF α раненым животным возвращало этот показатель к контрольным значениям. По-видимому, ЭГ и GM-CSF стимулируют рекрутирование целомоцитов в ткани, что снижает количество целомоцитов в ЦЖ. TNF α способен стимулировать

рекрутирование целомоцитов при ранении в еще большей степени, чем GM-CSF и ЭГ. Совместное введение GM-CSF и ЭГ также предотвращало повышение концентрации целомоцитов при ранении.

Содержание фагоцитов Ф1 (рис. 1Б) и Ф2 (рис. 1В) было одинаковым в начальный момент (0 мин) после инъекции ФСБН. Но через сутки содержание Ф2-фагоцитов значительно превышало таковое Ф1-фагоцитов, что свидетельствует о преимущественном рекрутировании в ткани Ф1-фагоцитов. Как и в случае целомоцитов, ранение повышало содержание Ф1-фагоцитов в целомиической жидкости по сравнению с контролем. ЭГ стимулировал рост содержания Ф1 при ранении по сравнению с одним ранением. Напротив, TNF α и GM-CSF снижали повышение содержания Ф1 при ранении, хотя GM-CSF повышал содержание этих клеток у интактных жи-

вотных. По-видимому, цитокины увеличивают, а ЭГ подавляет рекрутирование этих клеток в ткани. Эффект одновременного введения GM-CSF и ЭГ на содержание Ф1-фагоцитов, как и в случае целомоцитов, демонстрирует наличие разных механизмов их действия на эти клетки.

Напротив, содержание Ф2-фагоцитов (рис. 1В) снижалось при ранении по сравнению с контролем через 1 сут. Действие TNF α было направлено на снижение рекрутирования Ф2-фагоцитов в ткани раненых животных. Ни ЭГ, ни GM-CSF, не влияли на содержание Ф2-фагоцитов при ранении, что свидетельствует о том, что их действие связано преимущественно с влиянием на Ф1-фагоциты. Соответственно, цитокины, по-видимому, вызывали сдвиг соотношения фагоцитов двух типов в тканях в сторону преобладания Ф1-фагоцитов, а ЭГ — Ф2-фагоцитов.

ТАБЛИЦА 1. СВЯЗЫВАНИЕ РАСТИТЕЛЬНЫХ ЛЕКТИНОВ ПОВЕРХНОСТНЫМИ РЕЦЕПТОРАМИ ФАГОЦИТОВ Ф1 И Ф2 ЧЕРЕЗ 1 СУТ. ПОСЛЕ РАНЕНИЯ И ИНЪЕКЦИИ ПРЕПАРАТОВ, М $\pm$ С

TABLE 1. BINDING OF PLANT LECTINS TO SURFACE RECEPTORS OF PHAGOCYTES P1 AND P2 1 DAY AFTER INJURY AND INJECTION OF PREPARATIONS, M $\pm$ S

Тип воздействия Group	Лектины, % связывания Lectins, % of binding			
	Con A		DBA	
	Ф1 P1	Ф2 P2	Ф1 P1	Ф2 P2
Контроль Control	16,9 $\pm$ 6,8	18,1 $\pm$ 1,8	25,9 $\pm$ 3,4	31,7 $\pm$ 5,4
Рана Wound	40,9 $\pm$ 5,6*	22,4 $\pm$ 3,5	23,9 $\pm$ 8,2	22,3 $\pm$ 5,1
Рана + GM-CSF Wound + GM-CSF	28,1 $\pm$ 11,1	22,4 $\pm$ 3,4	10,5 $\pm$ 2,3*	13,0 $\pm$ 3,9*
GM-CSF	25,8 $\pm$ 3,6*	32,4 $\pm$ 4,2*	24,7 $\pm$ 0,3	28,6 $\pm$ 0,7
Рана + ЭГ Wound + EH	27,7 $\pm$ 1,8*	31,9 $\pm$ 6,1*	24,2 $\pm$ 4,6	13,3 $\pm$ 0,4*
ЭГ EH	35,6 $\pm$ 4,7*	40,3 $\pm$ 3,8*	28,6 $\pm$ 1,9	43,1 $\pm$ 12,5
Рана + TNF α Wound + TNF α	17,1 $\pm$ 1,9	15,4 $\pm$ 0,8	5,9 $\pm$ 0,7*	29,4 $\pm$ 1,7
Рана + ЭГ + GM-CSF Wound + EH + GM-CSF	34,5 $\pm$ 7,3	18,5 $\pm$ 3,5	—	—

Примечание. * — $p < 0,05$ по сравнению с контролем. $n = 4$.

Note. *, $p < 0.05$ compared to control. $n = 4$.

Свежевыделенные фагоциты $\Phi 1$ и $\Phi 2$ связывали *conA* в одинаковой пропорции (табл. 1), при этом отмечена тенденция к более низкому связыванию DBA в $\Phi 2$ -фагоцитах по сравнению с $\Phi 1$ -клетками. Ранение вызывало в $\Phi 1$ -фагоцитах достоверное увеличение связывания *conA*, но не DBA.

В $\Phi 2$ -фагоцитах, напротив, связывание DBA, но не *conA*, снизилось на 30%. Известно, что рецепторы к *conA* экспрессируются при апоптозе или аутофагии [14] в ответ на увеличение продукции активных форм кислорода (АФК), поэтому увеличение связывания этого лектина при ранении указывает на активацию $\Phi 1$ -фагоцитов. Изменения в связывании *conA* в $\Phi 1$ -фагоцитах при действии препаратов свидетельствуют о том, что ЭГ и GM-CSF, по-видимому, стимулируют функциональную активность $\Phi 1$ -фагоцитов у интактных животных, но при ранении достоверного эффекта по сравнению с действием самого ранения не оказывают, а TNF α даже ингибирует повышение функциональной активности, вызываемое самим ранением. По-видимому, это связано с тем, что, несмотря на то, что GM-CSF и TNF α известны своей способностью вызывать поляризацию макрофагов по M1-пути, их эффекты могут регулироваться по механизму обратной связи [4].

TNF α и GM-CSF снижали связывание DBA в $\Phi 1$ -фагоцитах у раненых животных по сравнению с ранением, хотя GM-CSF не влиял на показатель у интактных животных. ЭГ не влиял на связывание DBA в $\Phi 1$ -фагоцитах ни у интактных, ни у раненых животных. Связывание DBA с поверхностными рецепторами характеризует дифференцирующиеся клетки [12], и полученные результаты свидетельствуют о возможном снижении уровня дифференцированных клеток $\Phi 1$ в общем пуле в связи с необходимостью их восполнения вследствие рекрутирования в поврежденные ткани. Это предположение подтверждается тенденцией к снижению в 1,4 раза связывания в $\Phi 1$ -фагоцитах раненых животных лектина из *Glycine max* (SBA), с $26,6 \pm 2,0\%$ до $18,7 \pm 3,1\%$ ($p > 0,05$). Уровень SBA находится в прямом соотношении со зрелостью клеток [10]. Снижение числа дифференцированных клеток при инъекции GM-CSF и TNF α подтверждает, что эти цитокины ускоряют рекрутирование $\Phi 1$ -фагоцитов в ткани раненых животных. Отсутствие же эффекта ЭГ на уровень зрелости клеток, по-видимому, связано с тем, что он не влиял на рекрутирование $\Phi 1$ -фагоцитов.

В $\Phi 2$ -фагоцитах, как и в $\Phi 1$, ЭГ и GM-CSF стимулировали связывание *conA* у интактных животных по сравнению с контролем. У раненых животных инъекция GM-CSF, как и TNF α , не вызывала такого повышения по сравнению с ранением, а ЭГ достоверно повышал уровень связывания. Это свидетельствует в пользу предположения о том, что GM-CSF стимулирует преимущественно активность $\Phi 1$ -фагоцитов, а ЭГ — $\Phi 2$ -клеток. Совместное введение ЭГ и GM-CSF раненым животным не приводило к стимуляции связывания *conA* по сравнению с контролем. Можно предположить наличие конкуренции между двумя препаратами за связывание с рецептором, содержащим остаток маннозы.

Ни ЭГ, ни GM-CSF не влияли на связывание DBA в $\Phi 2$ -фагоцитах интактных животных по сравнению с контролем, но оба препарата снижали более чем в 2 раза этот показатель у раненых животных. Это свидетельствует об увеличении под их влиянием числа незрелых $\Phi 2$ -фагоцитов. По-видимому, оба препарата способствуют ускорению рекрутирования $\Phi 2$ -фагоцитов в ткани. TNF α у раненых животных не влиял на этот показатель по сравнению с контролем, что соответствует полученным данным об отсутствии изменений в содержании $\Phi 2$ -фагоцитов в этой экспериментальной группе по сравнению с контролем и свидетельствует об отсутствии влияния TNF α на рекрутирование $\Phi 2$ -фагоцитов.

Происходящие изменения активности фагоцитов при действии препаратов сопровождались различными эффектами на заживление раны. Так, при исходной длине разреза $5,8 \pm 1,2$ мм, при введении GM-CSF это значение составило $7,4 \pm 1,3$ мм, TNF α — $3,9 \pm 0,8$ мм, ЭГ — $3,5 \pm 0,4$ мм. Только ЭГ достоверно ($p < 0,05$) снижал длину раны.

Таким образом, наблюдающееся при воздействии GM-CSF и TNF α преимущественное рекрутирование $\Phi 1$ -фагоцитов в ткани раненых животных происходит наряду со снижением их функциональной активности. Это может свидетельствовать о возможной трансформации $\Phi 1$ -фагоцитов в $\Phi 2$ -фагоциты для поддержания баланса между про- и противовоспалительными эффектами ранения. В отличие от цитокинов, ЭГ не только подавлял функциональную активность $\Phi 1$ -фагоцитов, но и стимулировал активность $\Phi 2$ -фагоцитов и их рекрутирование в ткани. Основываясь на морфофункциональном сходстве между $\Phi 2$ -фагоцитами и M2-макрофагами, можно предполагать, что такое действие ЭГ способ-

ствуется заживлению раны в большей степени, чем при воздействии цитокинов.

Выводы

1. GM-CSF и TNF α избирательно модулируют активность двух типов фагоцитов голотурии, с преимущественным влиянием на Φ 1-клетки.

2. Скорость заживления раны при воздействии ЭГ более высокая, чем при действии цитокинов, что, по-видимому, связано с его способностью вызывать преимущественную активацию Φ 2-фагоцитов и их рекрутирование в ткани.

3. Φ 2-фагоциты играют важную роль в ранозаживлении.

Список литературы / References

1. Долматова Л.С., Уланова О.А. Влияние экстракта из голотурий на скорость заживления раны поверхностного покрова и динамику концентрации целомоцитов в модельном эксперименте // Здоровье. Медицинская экология. Наука, 2014. № 3 (57). С. 23-25. [Dolmatova L.S., Ulanova O.A. The effects of holothurian extract on rate of healing the body cover wound and dynamics of coelomocyte concentration in model experiment. *Zdorovye. Meditsinskaya ekologiya. Nauka = Health. Medical Ecology. Science*, 2014, no. 1, pp. 23-25. (In Russ.)]
2. Долматова Л.С., Уланова О.А., Долматов И.Ю. Сравнительное исследование действия дексаметазона и нового экстракта из голотурий на уровень цитокиноподобных веществ в отдельных типах иммунных клеток голотурии *Eupentacta fraudatrix* // Тихоокеанский медицинский журнал, 2014. № 1. С. 13-17. [Dolmatova L.S., Ulanova O.A., Dolmatov I.Yu. Comparative study of the effect of dexamethasone and new holothurians' extract on the level of the cytokine similar substances in certain immune cell types in the holothurian *Eupentacta fraudatrix*. *Tikhookeanskiy meditsinskiy zhurnal = Pacific Medical Journal*, 2014, no. 1, pp. 13-17. (In Russ.)]
3. Зурочка А.В., Зурочка В.А., Добрынина М.А., Гриценко В.А. Иммунобиологические свойства гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора и синтетических пептидов его активного центра // Медицинская иммунология, 2021. Т. 23, № 5. С. 1031-1054. [Zurochka A.V., Zurochka V.A., Dobrynina M.A., Gritsenko V.A. Immunobiological properties of granulocyte macrophage colony-stimulating factor and synthetic peptides of his active center. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2021, Vol. 23, no. 5, pp. 1031-1054. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-IPO-2216.
4. Ярилин Д.А. Роль фактора некроза опухолей в регуляции воспалительного ответа моноцитов и макрофагов // Иммунология, 2014. № 4. С. 195-201. [Yarilin D.A. Role of tumor necrosis factor in the regulation of the inflammatory response of monocytes and macrophages. *Immunologia = Immunologia*, 2014, no. 4, pp. 195-201. (In Russ.)]
5. Dolmatov I.Y. Variability of regeneration mechanisms in echinoderms. *Rus. J. Mar. Biol.*, 2020, Vol. 46, no. 6, pp. 391-404.
6. Dolmatova L.S., Dolmatov I.Y. Lead induces different responses of two subpopulations of phagocytes in the holothurian *Eupentacta fraudatrix*. *J. Ocean Univ. China*, 2018, Vol. 17, pp. 1391-1403.
7. Dolmatova L.S., Karaulova, E.P. Studies of the role of phagocytes in superficial wound healing in the holothurian *Eupentacta fraudatrix*. *Paleontol. J.*, 2024, Vol. 58, Suppl. 3, pp. S258-S270.
8. 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.
9. Fraternali A., Brundu S., Magnani M. Polarization and repolarization of macrophages. *J. Clin. Cell. Immunol.*, 2015, Vol. 6, no. 2, 319. doi: 10.4172/2155-9899.100031.
10. Krugluger W., Gessl A., Boltz-Nitulescu G., Förster O. Lectin binding of rat bone marrow cells during colony-stimulating factor type 1-induced differentiation: soybean agglutinin as a marker of mature rat macrophages. *J. Leukoc. Biol.*, 1990, Vol. 48, pp. 541-548.
11. McKenzie A.N.J., Preston T.M. Functional studies on *Calliphora vomitoria* haemocyte subpopulations defined by lectin staining and density centrifugation. *Dev. Comp. Immunol.*, 1992, Vol. 16, pp. 19-30.
12. Nash R., Neves L., Faast R., Pierce M., Dalton S. The lectin *Dolichos biflorus* agglutinin recognizes glycan epitopes on the surface of murine embryonic stem cells: a new tool for characterizing pluripotent cells and early differentiation. *Stem Cells*, 2007, Vol. 25, no. 4, pp. 974-982.
13. Ramírez-Gómez F., Aponte-Rivera F., Méndez-Castaner L., García-Arrarás J.E. Changes in holothurian coelomocyte populations following immune stimulation with different molecular patterns. *Fish Shellfish Immunol.*, 2010, Vol. 29, pp. 175-185.

14. Seco-Rovira V., Beltrán-Frutos E., Ferrer C., Sánchez-Huertas M.M., Madrid J.F., Saez F.J., Pastor L.M. Lectin histochemistry as a tool to identify apoptotic cells in the seminiferous epithelium of Syrian hamster (*Mesocricetus auratus*) subjected to short photoperiod. *Reprod. Domest. Anim.*, 2013, Vol. 48, no. 6, pp. 974-983.
15. Wu J., Zhang L., Shi J., He R., Yang W., Habtezion A., Niu N., Lu P., Xue J. Macrophage phenotypic switch orchestrates the inflammation and repair/regeneration following acute pancreatitis injury. *EbioMedicine*, 2020, Vol. 58, 102920. doi: 10.1016/j.ebiom.2020.102920.

Автор:

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

Author:

Dolmatova L.S., PhD (Biology), Leading Researcher, Laboratory of Biochemistry, V.I. Il'ichev Pacific Oceanological Institute, Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences, Vladivostok, Russian Federation

Поступила 30.03.2025

Отправлена на доработку 15.04.2025

Принята к печати 25.05.2025

Received 30.03.2025

Revision received 15.04.2025

Accepted 25.05.2025

ЭФФЕКТ ТРЕХМЕСЯЧНОГО ПОСТУПЛЕНИЯ КРЕМНИЯ С ПИТЬЕВОЙ ВОДОЙ НА МОРФОЛОГИЮ АВИДИН-ПОЗИТИВНЫХ ТУЧНЫХ КЛЕТОК СЕЛЕЗЕНКИ МЫШЕЙ

Гордова В.С.¹, Григорьева Е.А.², Сергеева В.Е.², Смородченко А.Т.³

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

² ФГБОУ ВО «Чувашский государственный университет имени И.Н. Ульянова», г. Чебоксары, Чувашская Республика, Россия

³ Медицинская школа Берлина — Университет здоровья и медицины, Берлин, Германия

Резюме. Мы изучаем реакции адаптации внутренних органов лабораторных грызунов на поступление с питьевой водой кремния в течение многих лет. Тучные клетки (ТК) лимфоидных органов являются одним из объектов нашего интереса. Они содержат нейромедиаторные биогенные амины и гепарин, который можно непосредственно найти в них с помощью авидина. Выявлена реакция авидин-позитивных ТК селезенки лабораторных мышей на поступление кремния с питьевой водой в концентрации 20 мг/л в течение трех месяцев. В эксперименте использовали белых лабораторных нелинейных мышей-самцов. Контрольная группа животных получала *ad libitum* питьевую бутилированную воду с концентрацией кремния 10 мг/л, опытная — ту же воду, в которую был добавлен метасиликат натрия девятиводный, так, чтобы общая концентрация кремния составила 20 мг/л. Массовую концентрацию кремния в воде определяли с помощью спектрометра эмиссионного с индуктивно связанной плазмой 5110 ICP-OES. Через три месяца животные были выведены из эксперимента, селезенку извлекали, фиксировали в 10%-ном нейтральном формалине и заливали в парафин. Депарафинированные срезы окрашивали авидином, меченным флуоресцентной меткой зеленого цвета (Avidin, Alexa Fluor® 488 conjugate, Invitrogen, Германия). Препараты изучали при помощи люминесцентного микроскопа с длиной волны возбуждающего света 495 нм. В красной пульпе селезенки мышей, получавших с питьевой водой кремний, наблюдалось увеличение количества авидин-позитивных ТК. Медиана площади ТК селезенки мышей опытной группы имела тенденцию к уменьшению за счет возрастания доли клеток малого размера. У мышей, получавших с питьевой водой кремний, ТК большого размера имели более высокие показатели люминесценции, то есть в них находится больше гепарина, чем в ТК селезенки мышей контрольной группы. Поступление с питьевой водой кремния в концентрации 20 мг/л в течение трех месяцев приводит к перераспределению популяции ТК в красной пульпе селезенки мышей по размеру, к увеличению интенсивности флуоресценции авидин-позитивных ТК большого размера, что свидетельствует об увеличении в них количества гепарина.

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

Адрес для переписки:

Гордова Валентина Сергеевна
ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет
имени Иммануила Канта»
236041, Россия, г. Калининград,
ул. Александра Невского, 14.
Тел.: 8 (905) 343-43-67.
E-mail: crataegi@rambler.ru

Address for correspondence:

Valentina S. Gordova
Immanuel Kant Baltic Federal University
14 Alexander Nevsky St
Kaliningrad
236041 Russian Federation
Phone: +7 (905) 343-43-67.
E-mail: crataegi@rambler.ru

Образец цитирования:

В.С. Гордова, Е.А. Григорьева, В.Е. Сергеева,
А.Т. Смородченко «Эффект трехмесячного
поступления кремния с питьевой водой на морфологию
авидин-позитивных тучных клеток селезенки мышей»
// Российский иммунологический журнал, 2025. Т. 28,
№ 3. С. 529–532.

doi: 10.46235/1028-7221-17116-EOT

© Гордова В.С. и соавт., 2025

Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

V.S. Gordova, E.A. Grigoryeva, V.E. Sergeeva,
A.T. Smorodchenko “Effects of three-month intake of silicon
from drinking water on the morphology of avidin-positive mast
cells in murine spleen”, Russian Journal of Immunology/
Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2025, Vol. 28, no. 3,
pp. 529–532.

doi: 10.46235/1028-7221-17116-EOT

© Gordova V.S. et al., 2025

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

DOI: 10.46235/1028-7221-17116-EOT

EFFECTS OF THREE-MONTH INTAKE OF SILICON FROM DRINKING WATER ON THE MORPHOLOGY OF AVIDIN-POSITIVE MAST CELLS IN MURINE SPLEEN

Gordova V.S.^a, Grigoryeva E.A.^b, Sergeeva V.E.^b, Smorodchenko A.T.^c

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

^b I. Ulyanov Chuvash State University, Cheboksary, Chuvash Republic, Russian Federation

^c Medical School Berlin – University of Health and Medicine, Berlin, Germany

Abstract. We studied the inner organ adaptation in experimental rodents to silicon intake from drinking water over many years. Mast cells (MC) are the objects of our special interest. They contain neurotransmitters, biogenic amines and heparin, which can be directly found in them with avidin staining. We studied the reactions of avidin-positive MC in the spleen of laboratory mice, which consumed silicon in their drinking water (20 mg/L) during 3 months. The white laboratory male mice were divided in two groups. The control group of animals received *ad libitum* bottled drinking water with silicon (10 mg/L), whereas an experimental group received the same water with silicon supplemented with sodium metasilicate nonahydrate, thus achieving total silicon concentration of 20 mg/L. The mass concentration of silicon in water was determined using an inductively coupled plasma emission spectrometer 5110 ICP-OES. Three months later, the animals were sacrificed, the spleen was removed, fixed in 10% neutral formalin and embedded in paraffin. Dewaxed 6- μ m sections were incubated for 30 minutes at room temperature and stained with avidin labeled with a green fluorescent label (Avidin, Alexa Fluor® 488 conjugate, Invitrogen, Germany). The preparations were studied with fluorescence microscope at excitation wavelength of 495 nm. An increased number of avidin-positive MC was observed in the red pulp of spleens from mice treated with drinking water with silicon. The median size of MC in the spleen of mice in the experimental group tended to decrease due to increased proportion of small cells. In mice receiving drinking water with silicon, large mast cells have higher luminescence indices, i.e., they contained more heparin than mast cells from the spleen of animals in control group. Long-term silicon intake with drinking water at a concentration of 20 mg/L for three months leads to the size redistribution of MC population in the red pulp of murine spleen, along with increased fluorescence intensity of large-sized avidin-positive MCs, thus suggesting an increased amount of heparin in these cells.

Keywords: spleen, mast cells, avidin-positive cells, silicon, silicates, heparin

Введение

Воздействие кремния, поступающего в организм с питьевой водой, исследуется нами уже на протяжении длительного времени. Отдельное внимание уделяется ТК, которые, как известно, вовлечены в процессы адаптации к окружающей среды и являются посредниками между нервными и иммунными процессами, проходящими в организме как в норме, так и при патологии. Использование окрашивания толуидиновым синим и вычисления индекса сульфатирования [4] позволило нам ранее выяснить, что ТК тимуса лабораторных крыс, получавших с питьевой водой кремний в течение двух месяцев, уменьшаются в размерах и содержат более сульфатированный гепарин, чем ТК крыс, получавших питьевую воду без добавления кремния. ТК селезенки крыс также имели тенденцию к метахромазии. Для исследования ТК в печени крыс в наших последних работах был использован меченный люминесцентной меткой авидин [3]. Известно, что глико-

протеид авидин селективно связывается с гепарином [2, 6] и интенсивность его флуоресценции прямо пропорциональна количеству гепарина в гранулах [7]. Учитывая отсутствие данных литературы о влиянии кремния на популяцию ТК в селезенке мышей, в настоящей работе мы применили меченный люминесцентной меткой авидин.

Целью работы явилось изучение реакции авидин-позитивных ТК селезенки лабораторных мышей на поступление с питьевой водой кремния в концентрации 20 мг/л в течение трех месяцев.

Материалы и методы

Эксперименты были проведены на белых нелинейных лабораторных мышах-самцах ($n = 6$) в стандартных условиях вивария при естественном освещении.

Животные получали в течение трех месяцев питьевую бутилированную воду, в которую был добавлен девятиводный метасиликат натрия. Для

контрольной группы ($n = 3$) массовая концентрация растворенных форм кремния составляла 10 мг/л, для опытной группы ($n = 3$) – 20 мг/л. Концентрацию кремния определяли спектрометром эмиссионным с индуктивно связанной плазмой 5110 ICP-OES [3]. После выведения из эксперимента у мышей извлекали селезенку, фиксировали ее в 10%-ном нейтральном формалине и заливали в парафин.

Депарафинированные срезы толщиной 6 мкм инкубировали 30 минут с авидином, меченным флуоресцентной меткой зеленого цвета (Avidin, Alexa Fluor® 488 conjugate, Invitrogen, Германия), согласно протоколу, описанному нами при изучении ТК в печени крыс [3]. Готовые препараты изучали под люминесцентным микроскопом при длине волны возбуждающего света 495 нм [2]. Микрофотографии были сделаны на микроскопе Leica 1000 с помощью камеры Amscore Mi 1000 и объектива $\times 40$, измерение площади ТК и интенсивность их флуоресценции проводили с применением в автоматическом режиме функции «цветной куб» в программе AmScore (версия 10.11.2024), интенсивность флуоресценции выражалась в условных единицах флуоресценции (у. е.). Для определения взаимосвязи между площадью клетки и ее интенсивностью флуоресценции использовали 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. Поскольку распределение выборок было ненормальным, средние данные представлены 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 средних величин считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

В красной пульпе селезенки мышей контрольной группы авидин-позитивные ТК имели яркую зеленую флуоресценцию, в единичных клетках приглушенного зеленого свечения визуализировались отдельные яркие гранулы. Количество ТК в красной пульпе селезенки опытной группы мышей, получавших с питьевой водой кремний, было визуально больше, чем у мышей контрольной группы. При этом визуализировались как очень яркие клетки, так и клетки с приглушенным зеленым свечением, среди которых также наблюдались клетки с единичными яркими гра-

нулами. Количество ТК на поле зрения при увеличении $\times 400$ составило в среднем 12–15 клеток, в то время как в селезенке мышей, получавших с питьевой водой кремний, их количество составило 20–22 клетки.

Медиана площади флуоресцирующих ТК, определенная с помощью функции «цветной куб», составила 60,52 (52,02–77,58) мкм² для мышей, получавших питьевую воду с кремнием в концентрации 10 мг/л, и 57,32 (42,01–75,29) мкм² для мышей, получавших питьевую воду с кремнием в концентрации 20 мг/л. Были проанализированы три размерные группы, полученные при помощи гистограммы: группа малых клеток ($< 39,80$ мкм²), группа средних клеток (39,80–82,40 мкм²), группа больших клеток ($> 82,40$ мкм²). Доля малых, средних и больших клеток в контрольной и опытной группе составила 12%, 67% и 21%, и 21%, 55% и 24% соответственно. Это свидетельствует о перераспределении клеток по размеру за счет увеличения доли малых клеток и уменьшения доли средних по размеру клеток. Доля больших по размеру ТК была сопоставима в обеих группах. Средняя интенсивность флуоресценции ТК селезенки мышей контрольной группы составила 95,01 (88,63–105,17) у. е., в то время как для мышей опытной группы этот показатель составил 105,2 (90,64–113,82) у. е. ($p < 0,05$). Коэффициент корреляции между размером клетки и интенсивностью люминесценции выявил прямую связь средней силы и для контрольной ($r_s = 0,41$), и для опытной групп ($r_s = 0,50$), то есть с увеличением размера клетки увеличивается количество в ней гранул гепарина, с которым связывается авидин. Средняя интенсивность флуоресценции ТК у мышей контрольной группы составила для малых, средних и больших клеток 88,63 (81,77–94,68) у. е., 105,17 (100,09–106,23) у. е. и 90,12 (86,04–102,90) у. е. соответственно, а в опытной – 89,705 (86,64–102,80) у. е., 105,84 (91,24–110,19) у. е. и 114,34 (104,53–119,79) у. е. соответственно. Полученные данные дополняют ранее собранную нами информацию об обеспеченности селезенки мышей гистамином при поступлении с питьевой водой кремния: наблюдалось уменьшение абсолютной люминесценции гистамина в красной пульпе селезенки мышей, получавших в течение трех месяцев с питьевой водой кремний в концентрации 20 мг/л [1]. Поскольку авидин связывается с гепарином, а гепарин способен связывать и дезактивировать нейромедиаторные биогенные амины [5], мы предполагаем, что ответственными за снижение интенсивности люминесценции гистамина в красной пульпе селезенки, а следовательно, и за снижение одного из компонентов иммунного воспаления являются ТК. То есть можно считать, что реакция селезенки мышей на поступление с питьевой водой

кремния сходна с таковой у крыс в ранее проведенном нами эксперименте [1].

Заключение

Таким образом, поступление с питьевой водой кремния в концентрации 20 мг/л в течение трех

месяцев приводит к перераспределению популяции ТК в красной пульпе селезенки мышей по размеру, к увеличению интенсивности флуоресценции авидин-позитивных ТК большого размера, что свидетельствует об увеличении в них количества гепарина.

Список литературы / References

1. Гордова В.С., Сергеева В.Е., Сапожников С.П. Морфологическая адаптация внутренних органов к поступлению в организм водорастворимого соединения кремния. Чебоксары: Издательство Чувашского университета, 2021. 208 с. [Gordova V.S., Sergeeva V.E., Sapozhnikov S.P. Morphological adaptation of internal organs to the intake of a water-soluble silicon compound into the body]. Cheboksary: Publishing house of the Chuvash University, 2021. 208 p.
2. 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). *Sovremennye tehnologii v meditsine = Modern Technologies in Medicine*, 2021, Vol. 13, no. 4, pp. 93-109. (In Russ.)]
3. 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 // Российский иммунологический журнал, 2024. Т. 27, № 2. С. 157-160. [Grigoryeva E.A., Gordova V.S., Sergeeva V.E., Smorodchenko A.T., Smirnova N.V. Avidin-positive mast cells of the liver when exposed to water-soluble silicon for nine months. *Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2024, Vol. 27, no. 2, pp. 157-160. (In Russ.)] doi: 10.46235/1028-7221-16863-AMC.
4. Ильина Л.Ю., Сапожников С.П., Козлов В.А., Дьячкова 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. (In Russ.)]
5. 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. (In Russ.)]
6. Kett W.C., Osmond R.I., Moe L., Skett S.E., Kinnear B.F., Coombe D.R. Avidin is a heparinbinding protein. Affinity, specificity and structural analysis. *Biochim. Biophys. Acta*, 2003, Vol. 1620, no. 1-3, pp. 225-234.
7. Zhang Y., Ramos B.F., Jakschik B.A. Augmentation of reverse arthus reaction by mast cells in mice. *J. Clin. Invest.*, 1991, Vol. 88, no. 3, pp. 841-846.

Авторы:

Гордова В.С. — к.м.н., доцент кафедры фундаментальной медицины Высшей школы медицины ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта», г. Калининград, Россия

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

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

Authors:

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

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

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

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

Поступила 17.03.2025

Отправлена на доработку 09.05.2025

Принята к печати 25.05.2025

Received 17.03.2025

Revision received 09.05.2025

Accepted 25.05.2025

ОЦЕНКА ЦИТОТОКСИЧНОСТИ ФУЛЛЕРЕНОЛА C₆₀(OH)₂₂₋₂₄ В ОТНОШЕНИИ НК-КЛЕТОК ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА *IN VITRO*

Тимганова В.П.¹, Бочкова М.С.^{1,2}, Усанина Д.И.^{1,2}, Долгих М.Д.^{1,2},
Лазарев С.С.¹, Раев М.Б.^{1,2}, Заморина С.А.^{1,2}

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

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

Резюме. Полигидроксированные фуллерены (фуллеренолы) C₆₀(OH)_n являются наиболее перспективными аллотропами углерода благодаря гидрофильности, стабильности и низкой токсичности. В то же время НК-клетки, ключевые клетки противовирусного и противоопухолевого иммунного ответа, практически не изучены как мишень для наночастиц фуллеренола. Целью исследования являлась оценка иммуносовместимости гидроксированного фуллеренола C₆₀(OH)₂₂₋₂₄ с CD3⁺CD56⁺НК-клетками периферической крови человека, а также исследование интернализации наночастиц в клетки. Исследования были проведены на мононуклеарных клетках периферической крови здоровых доноров (n = 4). В экспериментах использовали фуллеренол (MST-WS60-Bio (fullerenol) C₆₀(OH)₂₄ 99,99%, МСТ-Нано, Россия; размер кластеров ~130 нм) в концентрациях 200, 100, 50, 25, 12,5, 5, 2,5, 0,5 и 0,25 мкг/мл. Контролем служили лунки без добавления наночастиц. Клетки инкубировали в присутствии фуллеренола в течение 24, 48 и 72 часов в условиях 5% CO₂ и 37 °С. Оценивали жизнеспособность НК-клеток (CD3⁺CD56⁺), а также адгезию/интернализацию фуллеренола в клетки с применением проточной цитометрии. Установлено, что наночастицы фуллеренола в концентрациях 0,2-200 мкг/мл не обладают цитотоксичностью в отношении НК-клеток в изучаемые сроки наблюдения (24, 48, 72 ч). Так, не выявлено статистически значимого уменьшения процента и абсолютного количества живых НК-клеток в 24-, 48-, 72-часовых культурах с фуллеренолом. Показано, что НК-клетки не демонстрируют адгезию/интернализацию наночастиц фуллеренола в низких концентрациях — 0,25-50 мкг/мл во все периоды наблюдения (24, 48, 72 ч), однако высокие концентрации фуллеренола были зафиксированы внутри НК-клеток на 48 и 72 ч наблюдения. Установлено, что на 72 ч наблюдения ~10% НК-клеток адгезировали/интернализировали фуллеренол в концентрации 100 мкг/мл и 50% НК-клеток адгезировали/интернализировали фуллеренол в концентрации

Адрес для переписки:

Заморина Светлана Анатольевна
Институт экологии и генетики микроорганизмов
Уральского отделения Российской академии наук
614081, Россия, г. Пермь, ул. Голева, 13.
Тел.: 8 (342) 280-77-94.
Факс: 8 (342) 280-92-11.
E-mail: mantissa7@mail.ru

Address for correspondence:

Svetlana A. Zamorina
Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms
13 Golev St
Perm
614081 Russian Federation
Phone: +7 (342) 280-77-94.
Fax: +7 (342) 280-92-11.
E-mail: mantissa7@mail.ru

Образец цитирования:

В.П. Тимганова, М.С. Бочкова, Д.И. Усанина,
М.Д. Долгих, С.С. Лазарев, М.Б. Раев, С.А. Заморина
«Оценка цитотоксичности фуллеренола C₆₀(OH)₂₂₋₂₄
в отношении НК-клеток периферической крови
человека *in vitro*» // Российский иммунологический
журнал, 2025. Т. 28, № 3. С. 533-540.
doi: 10.46235/1028-7221-17126-COF

© Тимганова В.П. и соавт., 2025
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

V.P. Timganova, M.S. Bochkova, D.I. Usanina,
M.D. Dolgikh, S.S. Lazarev, M.B. Rayev, S.A. Zamorina
“Evaluation of cytotoxicity of fullerenol C₆₀(OH)₂₂₋₂₄ towards
human peripheral blood NK cells *in vitro*”, Russian Journal
of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2025,
Vol. 28, no. 3, pp. 533-540.
doi: 10.46235/1028-7221-17126-COF

© Timganova V.P. et al., 2025
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.46235/1028-7221-17126-COF

200 мкг/мл. Таким образом, впервые показано, что НК-клетки адгезируют/интернализуют фуллеренол в больших концентрациях (100 и 200 мкг/мл), причем процент фуллеренол (PC7)-позитивных клеток возрастает с увеличением продолжительности культивирования и увеличением концентрации наночастиц. Фуллеренол также не оказывал цитотоксического действия на изучаемую субпопуляцию клеток.

Ключевые слова: фуллеренол $C_{60}(OH)_{22-24}$, НК-клетки, жизнеспособность, поглощение наночастиц, биосовместимость, культивирование *in vitro*

EVALUATION OF CYTOTOXICITY OF FULLERENOL $C_{60}(OH)_{22-24}$ TOWARDS HUMAN PERIPHERAL BLOOD NK CELLS *IN VITRO*

Timganova V.P.^a, Bochkova M.S.^{a, b}, Usanina D.I.^{a, b}, Dolgikh M.D.^{a, b}, Lazarev S.S.^a, Rayev M.B.^{a, b}, Zamorina S.A.^{a, b}

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

^b Perm State University, Perm, Russian Federation

Abstract. Polyhydroxylated fullerenes, commonly referred to as fullerenols, are among the most promising carbon allotropes due to their hydrophilic nature, stability, and low toxicity. Natural Killer (NK) cells are key players of the antiviral and antitumor immune response. However, they have been largely understudied as targets for fullereneol nanoparticles. The aim of this work was to assess the immunocompatibility of hydroxylated fullereneol $C_{60}(OH)_{22-24}$ with CD3⁺CD56⁺NK cells from human peripheral blood, as well as to study internalization of these nanoparticles into the cells. The studies were conducted with mononuclear cells from peripheral blood of healthy donors (n = 4). Fullereneol (MST-WS60-Bio, fullereneol $C_{60}(OH)_{24}$ 99.99%, MST-Nano, Russia; cluster size approximately 130 nm) was used at concentrations of 200, 100, 50, 25, 12.5, 5, 2.5, 0.5, and 0.25 µg/mL. Wells without added nanoparticles served as controls. Cells were incubated in the presence of fullereneol for 24, 48, and 72 hours under conditions of 5% CO₂ and 37 °C. The viability of NK cells (CD3⁺CD56⁺) and the adhesion/internalization of fullereneol into the cells were assessed using flow cytometry. We have found that fullereneol nanoparticles at concentrations ranging from 0.25 to 200 µg/mL did not exhibit cytotoxicity towards NK cells during the observation periods of 24, 48, and 72 hours. Thus, no statistically significant decrease in the percentage and absolute number of live NK cells was detected in cultures with fullereneol over these time period. The study also showed that NK cells did not demonstrate adhesion/internalization of fullereneol nanoparticles at low concentrations (0.25-50 µg/mL) during all observation periods. However, high concentrations of fullereneol were detected inside NK cells at 48 and 72 hours of observation. After 72 hours, approximately 10% of NK cells did adhere/internalize fullereneol particles at a concentration of 100 µg/mL, with about 50% of cells consumed the particles at 200 µg/mL. Thus, for the first time, it was demonstrated that NK cells adhere/internalize fullereneol at high concentrations (100 and 200 µg/mL), and the percentage of fullereneol-positive cells increases at both longer cultivation period and higher nanoparticle concentration. Fullereneol didn't exhibit cytotoxic effects on the studied cell population.

Keywords: fullereneol $C_{60}(OH)_{22-24}$, NK cells, viability, nanoparticle internalization, biocompatibility, *in vitro* cultivation

Исследование проводили при финансовой поддержке РНФ, проект 24-15-00432 «Комплексное исследование иммуносовместимости фуллеренола $C_{60}(OH)_{22-24}$ ».

Введение

Полигидроксированные фуллерены (фуллеренолы) $C_{60}(OH)_n$ являются наиболее перспективными аллотропами углерода. Наноме-

тровый размер, большое отношение площади поверхности к объему, способность проникать через клеточные мембраны, адаптивная поверхность, которую можно легко модифицировать различными функциональными группами, высвобождение лекарств, высокая физическая стабильность в биологических средах, способность удалять свободные радикалы, магнитные и оптические свойства делают наночастицы фуллерено-

ла желанными кандидатами для различных биомедицинских приложений [14]. Благодаря легкой функционализации, фуллеренолы могут применяться для доставки в клетку лекарств и генетических векторов, а также в качестве адъювантов вакцин [1, 11].

Использование наноразмерных соединений углерода в биомедицинских разработках является «вызовом» иммунной системе, ранее не сталкивавшейся с подобными объектами. Однако исследования цитотоксичности фуллерена и его производных противоречивы: в ряде случаев фуллерен и его производные не влияют на жизнеспособность человеческих лейкоцитов, моноцитов и макрофагов *in vivo*, но в то же время наночастицы фуллеренола способны стимулировать функциональную активность макрофагов [16].

На данный момент нет информации о том, как наночастицы фуллеренола взаимодействуют с НК-клетками. НК-клетки — это лимфоидные цитотоксические клетки врожденного иммунитета, которые циркулируют в организме, представляя собой первую линию защиты от опухолевых и инфекционных заболеваний. Цитотоксические способности НК-клеток реализуются через лизис клеток-мишеней путем секреции цитолитических гранул гранзима и перфорина либо путем индукции апоптоза через TRAIL и FASL [7]. Помимо этого, натуральные киллеры способны секретировать большое количество цитокинов и хемокинов, в том числе $IFN\gamma$, $TNF\alpha$, GM-CSF и CCL5, модулируя адаптивный иммунный ответ [12].

Взаимодействие НК-клеток с наночастицами, как правило, изучается в контексте их противоопухолевого потенциала. Однако реакция НК-клеток на сами наночастицы, таким образом, остается без внимания. В немногочисленных работах отмечается способность НК-клеток интернализировать наноматериалы: нанозвезды, а также частицы, покрытые ПЭГом и глюкозой [10, 15]. При этом наночастицы способны индуцировать дегрануляцию НК-клеток: такой эффект обнаружен при использовании частиц оксида графена и оксида железа [13]. Однако интернализация не всегда ведет к высвобождению содержимого гранул [4]. Таким образом, НК-клетки по-разному реагируют на присутствие наночастиц, в зависимости от множества факторов.

Целью исследования являлась оценка иммуносовместимости наночастиц гидроксированного фуллеренола ($C_{60}(OH)_{22-24}$) с НК-клетками периферической крови человека в условиях *in vitro*. Для достижения поставленной цели, изучалась жизнеспособность НК-клеток после взаимодействия с наночастицами $C_{60}(OH)_{22-24}$, а также адгезия/интернализация наночастиц в клетки.

Материалы и методы

Характеристика используемого в работе фуллеренола $C_{60}(OH)_{22-24}$

В работе использовали фуллеренол (MST-WS60-Bio (fullerenol $C_{60}(OH)_{24}$ 99,99%), МСТ-Нано, Россия.

Физико-химическая характеристика фуллеренола была проведена в ИТХ УрО РАН (г. Пермь) к.т.н. Кисельковым Д.М. ИК-спектр подтвердил, что спектральные линии соответствуют полигидроксированным фуллеренам, ТГМ/ДСК анализ показал, что распад фуллеренола происходит в интервале 70–830 °С, электронный спектр водного раствора продемонстрировал отсутствие непрореагировавшего исходного фуллерена в исследуемом образце. Анализ спектров методом ЯМР ^1H , ^{13}C показал отсутствие органических примесей.

Рабочая суспензия фуллеренола (при концентрации 10 мг/мл) имела монодисперсный характер со средним размером агрегатов 130 нм, дзета-потенциал равен 34,44 мВ.

Количественное содержание эндотоксина в растворе фуллеренола оценивали с помощью LAL-теста (Chromogenic Endotoxin Quant Kit (Thermo Scientific, США)). Установлено, что при низких концентрациях стандарта эндотоксина (0,01–0,1 EU/мл) было обнаружено менее 0,01 EU/мл (0,006 EU/мл) эндотоксина в образцах фуллеренола, что соответствует общепринятым рекомендациям [8].

Объекты исследования

Исследование проводили в соответствии с Хельсинкской декларацией ВМА 2000 г. и протоколом Конвенции Совета Европы о правах человека и биомедицине 1999 г., на работу с образцами периферической крови было получено разрешение этического комитета ИЭГМ УрО РАН (IRB00010009) от 22.05.2024. У всех пациентов было получено информированное согласие. В работе использовали гепаринизированную кровь условно здоровых доноров ($n = 4$, возраст 18–25 лет). Мононуклеары выделяли центрифугированием в градиенте плотности фиколла-верографина (1,077 г/см³). Клетки культивировали в концентрации 1×10^6 кл/мл.

Дизайн исследования

Выделенные мононуклеарные клетки крови по 200 тыс. вносили в лунки 96-луночного планшета, после чего добавляли фуллеренол до конечных концентраций 200, 100, 50, 25, 12,5, 5, 2,5, 0,5 и 0,25 мкг/мл. Контролем служили лунки без добавления наночастиц. Клетки инкубировали в присутствии фуллеренола в течение 24, 48 и 72 часов во влажной атмосфере CO_2 -инкубатора (5% CO_2 , 37 °С).

По окончании инкубации клетки окрашивали антителами к поверхностному маркеру NK-клеток CD 56-AF700 (Biotechne, США), и к поверхностному маркеру T-клеток CD 3-PerCP (Miltenyi Biotec, Германия). Жизнеспособность клеток оценивали, применяя краситель Zombie Aqua (ZA) (BioLegend, США). Результаты представляли в процентах живых ZA-клеток в целевой субпопуляции CD3-CD56⁺. Дополнительно оценивали абсолютное количество живых клеток в целевой популяции. Дизайн нашего исследования не позволяет разделить процессы адгезии и интернализации наночастиц, поэтому мы используем термин «адгезия/интернализация». Адгезию/интернализацию наночастиц фуллеренола оценивали по интенсивности аутофлуоресценции клеток в канале PC7 ($\lambda_{\text{ex}} = 488$ нм; полосовой фильтр: 780/60 нм). Результаты выражали в проценте PC7⁺ клеток в целевой популяции NK-клеток. Жизнеспособность NK-клеток, а также адгезию/интернализацию ими наночастиц фуллеренола оценивали на проточном цитометре CytoFlex S (Beckman Coulter, США).

Ограничения используемых методов. Оценка процента высокогранулярных лимфоцитов методом проточной цитометрии показала противоречивые результаты, которые нельзя корректно интерпретировать без оценки экспрессии маркера дегрануляции CD107a.

Статистическую обработку данных проводили с использованием GraphPad Prism 8.0.1. Для статистического анализа использовали непараметрический аналог ANOVA (критерий Фридмана) и two-way RM ANOVA.

Результаты и обсуждение

Эффекты фуллеренола C₆₀(OH)₂₂₋₂₄ в концентрациях 0,25-200 мкг/мл на жизнеспособность NK-клеток

При изучении влияния наночастиц фуллеренола на жизнеспособность NK-клеток, не выявлено статистически значимого уменьшения как процента живых NK-клеток в 24-, 48-, 72-часовых культурах с фуллеренолом, так и их абсолютного количества (табл. 1).

В то же время мы зафиксировали снижение количества жизнеспособных NK-клеток в динамике наблюдения — если после 24 ч инкубации число клеток составляло примерно 50 тыс./лунка, то на 72 ч инкубации число клеток снижалось до 20 тыс./лунка, при этом присутствие наночастиц фуллеренола не влияло на этот процесс.

Таким образом, наночастицы фуллеренола в исследованных нами концентрациях не оказывают цитотоксического эффекта на субпопуляцию NK-клеток.

Адгезия/интернализация наночастиц фуллеренола C₆₀(OH)₂₂₋₂₄ NK-клетками периферической крови человека

Известно, что клетки способны фагоцитировать и интернализировать нано- и микрочастицы небиологического происхождения. Ранее было показано, что наночастицы способны интернализироваться и иммунными клетками, не относящимися к фагоцитам [6]. В то же время лимфоциты практически не адгезировали/интернализировали наночастицы оксида графена в наших предыдущих исследованиях [2].

Адгезию/интернализацию наночастиц фуллеренола NK-клетками оценивали на проточном цитометре по флуоресценции клеток, поглотивших фуллеренол, в канале для тандемного красителя PC7 (PE-Cy7).

Установлено, что низкие концентрации наночастиц фуллеренола практически не интернализуются NK-клетками — так, уровень PC7⁺ клеток не превышает 0,5% при сокультивированиях с фуллеренолом в концентрациях 0,25; 0,5; 2,5; 5; 12,5; 25 мкг/мл на всех сроках наблюдения. Незначительное повышение процента до 1,5% мы зафиксировали при использовании концентрации 50 мкг/мл на 48 и 72 ч инкубации (рис. 1А).

Однако мы показали, что NK-клетки адгезируют/интернализуют наночастицы фуллеренола при добавлении его в больших концентрациях (100 и 200 мкг/мл), причем процент PC7⁺ клеток возрастает с увеличением продолжительности культивирования и увеличением концентрации наночастиц (рис. 1).

В целом наночастицы, в том числе фуллеренолы, могут легко проникать в живые клетки посредством фагоцитоза, макропиноцитоза, эндоцитоза, опосредованного кавеолами, или эндоцитоза, опосредованного клатрином [9]. Физико-химические свойства наночастиц (размер, форма, поверхностный заряд и химия поверхности) влияют на эффективность их поглощения клетками, помимо этого, агрегация наночастиц может меняться в зависимости от состава среды и функциональных покрытий.

В 2020 году впервые представлены результаты исследования, ясно показывающие интернализацию фуллеренола C₆₀(OH)₃₆ в клетки и их адсорбцию на плазматической мембране. Авторы показали, что C₆₀(OH)₃₆ проникал в РВМС в количестве, пропорциональном его использованной концентрации и времени инкубации клеток. Это исследование также показало, что при более длительном времени инкубации внутриклеточное накопление фуллеренола преобладало над его адсорбцией на внешней гидрофильной поверхности клеточной мембраны [9]. Известно также, что фуллеренол способен адсорбироваться

ТАБЛИЦА 1. ПРОЦЕНТ ЖИВЫХ НК-КЛЕТОК И ИХ АБСОЛЮТНОЕ КОЛИЧЕСТВО В КУЛЬТУРАХ С ФУЛЛЕРЕНОЛОМ (n = 4), Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

TABLE 1. PERCENTAGE OF LIVING NK CELLS AND THEIR ABSOLUTE NUMBER IN CULTURES WITH FULLERENOL (n = 4), Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

Концентрация фуллеренола (мкг/мл) Fullerenol concentration (μg/mL)	Жизнеспособность [#] Viability [#]	Абсолютное кол-во живых клеток в лунке × 10 ³ Absolute number of living cells per well × 10 ³
24 часа / 24 hours		
Контроль / Control	99,14 (99,11-99,52)	27,72 (11,46-46,79)
0,25	99,38 (99,27-99,46)	26,87 (11,84-39,80)
0,5	99,08 (98,33-99,50)	22,79 (11,28-61,58)
2,5	99,47 (99,14-99,55)	30,68 (12,14-51,49)
5	99,34 (98,92-99,61)	29,75 (12,16-53,28)
12,5	99,49 (99,27-99,62)	30,55 (11,36-52,40)
25	99,44 (98,90-99,69)	33,48 (12,56-55,28)
50	99,20 (98,93-99,61)	31,89 (12,32-55,43)
100	99,43 (99,14-99,80)	29,35 (11,99-53,41)
200	98,71 (96,28-99,58)	25,63 (12,25-35,18)
48 часов / 48 hours		
Контроль / Control	98,87 (98,53-99,09)	21,78 (8,92-43,65)
0,25	98,35 (97,44-99,11)	20,37 (10,01-32,24)
0,5	98,85 (97,78-99,37)	17,49 (7,14-37,29)
2,5	98,86 (98,36-99,27)	19,24 (8,08-31,23)
5	98,83 (98,02-99,41)	19,90 (8,48-31,23)
12,5	98,89 (98,64-99,38)	19,02 (7,32-35,13)
25	99,32 (98,55-99,38)	17,12 (7,97-31,07)
50	99,27 (98,90-99,44)	20,73 (9,32-38,39)
100	99,13 (98,63-99,51)	24,47 (10,37-31,07)
200	97,95 (92,00-99,40)	18,81 (7,39-18,07)
72 часа / 72 hours		
Контроль / Control	98,43 (96,80-99,09)	13,78 (6,18-21,07)
0,25	98,56 (96,32-98,98)	15,73 (7,03-18,91)
0,5	98,56 (97,04-99,27)	15,20 (7,11-22,33)
2,5	98,47 (96,94-98,99)	14,94 (7,62-23,22)
5	98,13 (96,81-98,81)	17,15 (7,03-24,17)
12,5	98,64 (97,56-98,78)	18,28 (6,54-25,44)
25	98,96 (97,28-99,34)	15,25 (6,77-22,11)
50	98,73 (98,56-99,21)	18,77 (8,42-23,63)
100	98,27 (97,12-99,29)	15,94 (7,94-22,69)
200	98,36 (97,34-98,86)	8,47 (4,49-20,53)

Примечание. [#] – процент Zombie Aqua⁺ клеток в гейте CD3⁺CD56⁺ клеток; контроль – проба без фуллеренола.

Note. [#], percentage of Zombie Aqua⁺ cells in the gate of CD3⁺CD56⁺ cells; control, sample without fullerenol.

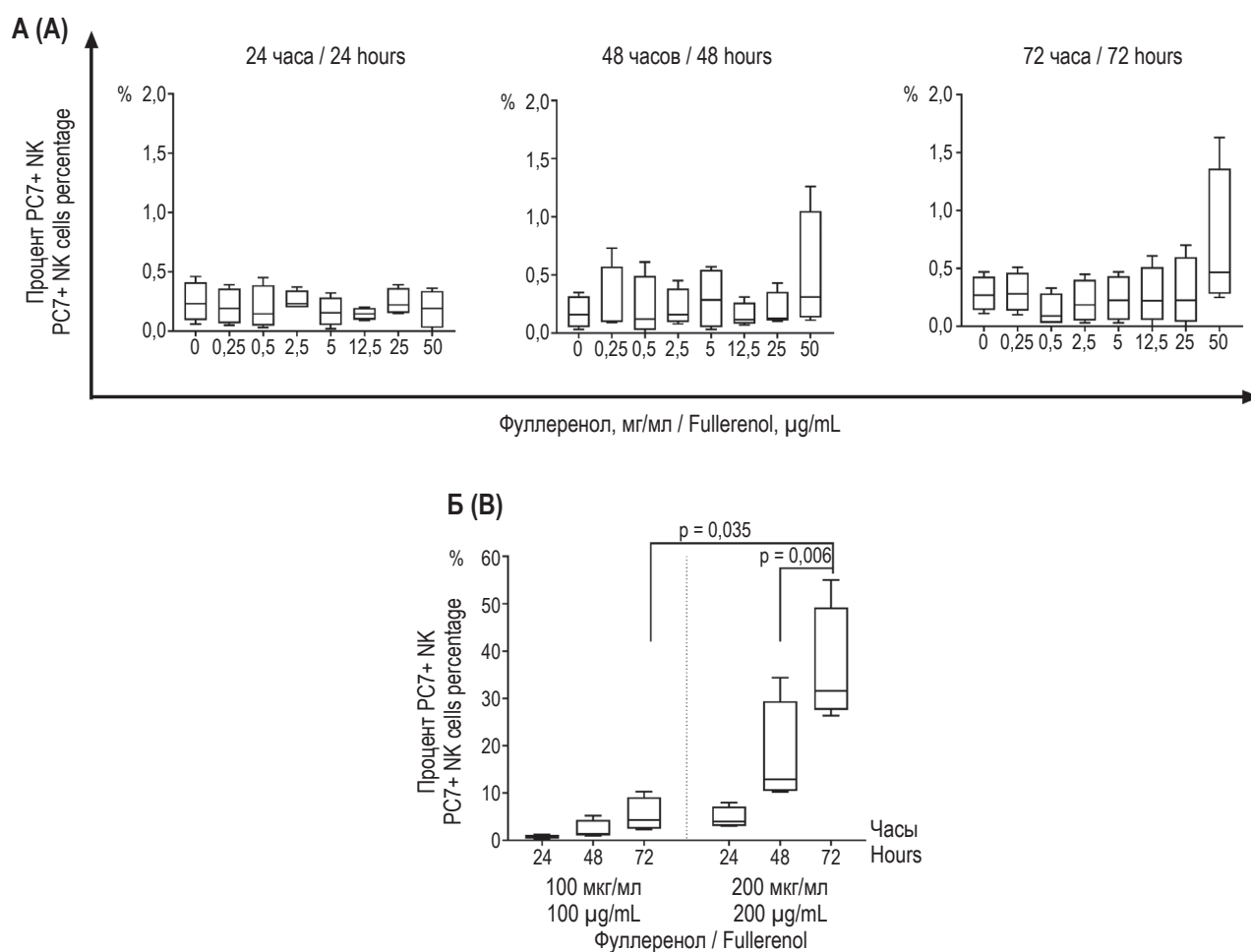


Рисунок 1. А – процент PC7⁺ (адгезировавших/интернализовавших фуллеренол) НК-клеток в культурах с концентрациями фуллеренола от 0,25 до 50 мкг/мл. Б – увеличение процента PC7⁺НК-клеток в культурах с 100 и 200 мкг/мл фуллеренола в процессе культивирования (n = 4)

Примечание. По оси х – концентрации фуллеренола, по оси у – процент PC7⁺ клеток в гейте CD3⁺CD56⁺ клеток. Показаны медианы, первый и третий квартили, минимальные и максимальные значения.

Figure 1. A, percentage of PC7⁺ (adherent/internalized fullerene) NK cells in cultures with fullerene concentrations from 0.25 to 50 µg/mL. B, increase in percentage of PC7⁺NK cells in cultures with 100 and 200 µg/mL fullerene during cultivation (n = 4)

Note. X-axis, fullerene concentrations; y-axis, percentage of PC7⁺ cells in the CD3⁺CD56⁺ cell gate. Medians, first and third quartiles, minimum and maximum values are shown.

на поверхности мембраны, особенно вблизи интегральных мембранных белков, таких как трансмембранные ионные насосы: АТФазы К/Na, Mg и Са, необратимо ингибируя активность этих ферментов [5].

Выводы

Установлено, что при возрастании концентрации фуллеренола во всех трех сериях эксперимента (24, 48 и 72 ч) наблюдается усиление поглощения наночастиц фуллеренола клетками, при сохранении их жизнеспособности.

Показано, что в присутствии наночастиц фуллеренола в концентрации 200 мкг/мл и

100 мкг/мл процент клеток, которые его интернализировали, достигал 50% и 10%, соответственно, однако, низкие концентрации фуллеренола (50, 25, 12,5, 5, 2,5, 0,5 и 0,25 мкг/мл) поглощались не более чем 0,3% НК-клеток на 24 ч, 1% на 48 ч и не более чем 1,5% на 72 ч наблюдения.

Таким образом, впервые установлено, что НК-клетки адгезируют/интернализуют фуллеренол в больших концентрациях (100 и 200 мкг/мл), причем процент клеток, интернализовавших фуллеренол, возрастает с увеличением продолжительности культивирования и концентрации наночастиц.

Список литературы / References

1. Масалова О.В., Леснова Е.И., Андреев С.М., Шершакова Н.Н., Козлов В.В., Пермякова К.Ю., Демидова Н.А., Валуев-Эллистон В.Т., Турецкий Е.А., Иванов А.В., Николаева Т.Н., Хайтов М.Р., Пронин А.В., Куш А.А. Адъювантное действие диспергированного фуллерена C_{60} на иммунный ответ на конструкции, содержащие аминокислоты и нуклеотидные последовательности неструктурного белка NS5B вируса гепатита С // Вопросы вирусологии, 2023. Т. 67, № 6. С. 516-526. [Masalova O.V., Lesnova E.I., Andreev S.M., Shershakova N.N., Kozlov V.V., Permyakova K.Y., Demidova N.A., Valuev-Elliston V.T., Turetskiy E.A., Ivanov A.V., Nikolaeva T.N., Khaitov M.R., Pronin A.V., Kushch A.A. Adjuvant effect of dispersed fullerene C_{60} on the immune response to constructs harboring amino acid and nucleotide sequences of hepatitis C virus nonstructural NS5B protein. *Voprosy virusologii = Problems of Virology*, 2023, Vol. 67, no. 6, pp. 516-526. (In Russ.)]
2. Ужвийук С.В., Храмов П.В., Раев М.Б., Тимганова В.П., Бочкова М.С., Хазиахматова О.Г., Малащенко В.В., Литвинова Л.С., Заморина С.А. Взаимодействие наночастиц оксида графена с моноклеарными клетками человека в системе Cell-IQ // Клеточные технологии в биологии и медицине, 2023. № 1. С. 62-68. [Uzhviyuk S.V., Khramtsov P.V., Raev M.B., Timganova V.P., Bochkova M.S., Khaziakhmatova O.G., Malashchenko V.V., Litvinova L.S., Zamorina S.A. Interaction of graphene oxide nanoparticles with human mononuclear cells in the cell-IQ system. *Kletochnye tekhnologii v biologii i meditsine = Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2023, Vol. 175, no. 1, pp. 172-178. (In Russ.)]
3. Alhallak K., Sun J., Muz B., Jeske A., O'Neal J., Ritchey J.K., Achilefu S., DiPersio J.F., Azab A.K. Liposomal phytohemagglutinin: *In vivo* T-cell activator as a novel pan-cancer immunotherapy. *J. Cell. Mol. Med.*, 2022, Vol. 26, no. 3, pp. 940-944.
4. Bouchlaka M.N., Ludwig K.D., Gordon J.W., Kutz M.P., Bednarz B.P., Fain S.B., Capitini C.M. (19)F-MRI for monitoring human NK cells *in vivo*. *Oncoimmunology*, 2016, Vol. 5, no 5, e1143996. doi: 10.1080/2162402X.2016.1143996.
5. Grebowski J., Krokosz A., Puchala M. Membrane fluidity and activity of membrane ATPases in human erythrocytes under the influence of polyhydroxylated fullerene. *Biochim. Biophys. Acta*, 2013, Vol. 1828, pp. 241-248.
6. Huq R., Samuel E.L., Sikkema W.K., Nilewski L.G., Lee T., Tanner M.R., Khan F.S., Porter P.C., Tajhya R.B., Patel R.S., Inoue T., Pautler R.G., Corry D.B., Tour J.M., Beeton C. Preferential uptake of antioxidant carbon nanoparticles by T lymphocytes for immunomodulation. *Sci. Rep.*, 2016, Vol. 6, 33808. doi: 10.1038/srep33808.
7. Imširović V., Wensveen F.M., Polić B., Jelenčić V. Maintaining the balance: regulation of NK cell activity. *Cells*, 2024, Vol. 13, no. 17, 1464. doi: 10.3390/cells13171464.
8. Jeong Y.H., Lennon G., Veldman G., Serna D.M., Ibrahimov A. Establishing endotoxin limits to enhance the reliability of *in vitro* immunogenicity risk assessments. *mAbs*, 2025, Vol. 17, no. 1. <https://doi.org/10.1080/19420862.2025.2458627>.
9. Lichota A., Piwoński I., Michlewska S., Krokosz A. A multiparametric study of internalization of fullereneol $C_{60}(OH)_{36}$ nanoparticles into peripheral blood mononuclear cells: cytotoxicity in oxidative stress induced by ionizing radiation. *Int. J. Mol. Sci.* 2020, Vol. 21, 2281. doi: 10.1016/j.canlet.2014.03.013.
10. Liu B., Cao W., Cheng J., Fan S., Pan S., Wang L., Niu J., Pan Y., Liu Y., Sun X., Ma L., Song J., Ni J., Cui D. Human natural killer cells for targeting delivery of gold nanostars and bimodal imaging directed photothermal/photodynamic therapy and immunotherapy. *Cancer Biol. Med.*, 2019, Vol. 16, no. 4, pp. 756-770.
11. Liu J., Feng X., Chen Z., Yang X., Shen Z., Guo M., Deng F., Liu Y., Zhang H., Chen C. The adjuvant effect of $C_{60}(OH)_{22}$ nanoparticles promoting both humoral and cellular immune responses to HCV recombinant proteins. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.*, 2019, Vol. 97, pp. 753-759.
12. Liu M., Liang S., Zhang C. NK cells in autoimmune diseases: protective or pathogenic? *Front. Immunol.*, 2021, Vol. 12, 624687. doi: 10.3389/fimmu.2021.624687
13. Loftus C., Saeed M., Davis D.M., Dunlop I.E. Activation of human natural killer cells by graphene oxide-templated antibody nanoclusters. *Nano Lett.*, 2018, Vol. 18, no. 5, pp. 3282-3289.
14. Seke M., Zivkovic M., Stankovic A. Versatile applications of fullereneol nanoparticles. *Int. J. Pharm.*, 2024, Vol. 660, 124313. doi: 10.1016/j.ijpharm.2024.124313.
15. Shamalov K., Meir R., Motiei M., Popovtzer R., Cohen C.J. Noninvasive tracking of natural killer cells using gold nanoparticles. *ACS Omega*, 2021, Vol. 6, no. 43, pp. 28507-28514.
16. Zhu J., Ji Z., Wang J., Sun R., Zhang X., Gao Y., Sun H., Liu Y., Wang Z., Li A., Ma J., Wang T., Jia G., Gu Y. Tumor-inhibitory effect and immunomodulatory activity of fullerol $C_{60}(OH)_x$. *Small*, 2008, Vol. 4, no. 8, pp. 1168-1175.

Авторы:

Тимганова В.П. — к.б.н., научный сотрудник лаборатории клеточной иммунологии и нанобиотехнологии, Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук — филиал ФГБУН «Пермский федеральный исследовательский центр» Уральского отделения Российской академии наук, г. Пермь, Россия

Authors:

Timganova V.P., PhD (Biology), Researcher, Laboratory of Cellular Immunology and Nanobiotechnology, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Perm Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation

Бочкова М.С. — к.б.н., научный сотрудник лаборатории клеточной иммунологии и нанобиотехнологии, Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук — филиал ФГБУН «Пермский федеральный исследовательский центр» Уральского отделения Российской академии наук; доцент кафедры микробиологии и иммунологии биологического факультета ФГАОУ ВО «Пермский государственный национальный исследовательский университет», г. Пермь, Россия

Усанина Д.И. — младший научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии, Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук — филиал ФГБУН «Пермский федеральный исследовательский центр» Уральского отделения Российской академии наук; аспирант кафедры микробиологии и иммунологии биологического факультета ФГАОУ ВО «Пермский государственный национальный исследовательский университет», г. Пермь, Россия

Долгих М.Д. — инженер лаборатории клеточной иммунологии и нанобиотехнологии, Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук — филиал ФГБУН «Пермский федеральный исследовательский центр» Уральского отделения Российской академии наук; магистрант кафедры микробиологии и иммунологии биологического факультета ФГАОУ ВО «Пермский государственный национальный исследовательский университет», г. Пермь, Россия

Лазарев С.С. — инженер лаборатории клеточной иммунологии и нанобиотехнологии, Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук — филиал ФГБУН «Пермский федеральный исследовательский центр» Уральского отделения Российской академии наук, г. Пермь, Россия

Раев М.Б. — д.б.н., заведующий лабораторией клеточной иммунологии и нанобиотехнологии, Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук — филиал ФГБУН «Пермский федеральный исследовательский центр» Уральского отделения Российской академии наук; профессор кафедры микробиологии и иммунологии биологического факультета ФГАОУ ВО «Пермский государственный национальный исследовательский университет», г. Пермь, Россия

Заморина С.А. — д.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории клеточной иммунологии и нанобиотехнологии, Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук — филиал ФГБУН «Пермский федеральный исследовательский центр» Уральского отделения Российской академии наук; профессор кафедры микробиологии и иммунологии биологического факультета ФГАОУ ВО «Пермский государственный национальный исследовательский университет», г. Пермь, Россия

Bochkova M.S., PhD (Biology), Researcher, Laboratory of Cellular Immunology and Nanobiotechnology, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Perm Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences; Assistant Professor, Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Biology, Perm State University, Perm, Russian Federation

Usanina D.I., Junior Researcher, Laboratory of Molecular Immunology, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Perm Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences; PhD Student, Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Biology, Perm State University, Perm, Russian Federation

Dolgikh M.D., Technician, Laboratory of Cellular Immunology and Nanobiotechnology, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Perm Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences; Master's Student, Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Biology, Perm State University, Perm, Russian Federation

Lazarev S.S., Technician, Laboratory of Cellular Immunology and Nanobiotechnology, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Perm Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation

Rayev M.B., PhD, MD (Biology), Head, Laboratory of Cellular Immunology and Nanobiotechnology, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Perm Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences; Professor, Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Biology, Perm State University, Perm, Russian Federation

Zamorina S.A., PhD, MD (Biology), Leading Researcher, Laboratory of Cellular Immunology and Nanobiotechnology, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Perm Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences; Professor, Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Biology, Perm State University, Perm, Russian Federation

Поступила 19.03.2025
Отправлена на доработку 09.05.2025
Принята к печати 25.05.2025

Received 19.03.2025
Revision received 09.05.2025
Accepted 25.05.2025

АНАЛИЗ ВЛИЯНИЯ ПРЕПАРАТА КК1 НА ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ И БИОХИМИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ У КРЫСЯТ, РОЖДЕННЫХ ОТ ПАССИВНО КУРИВШИХ КРЫС WISTAR

Кузьмичева Н.А., Смолягин А.И., Филиппова Ю.В.

ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ,
г. Оренбург, Россия

Резюме. Одним из широко распространенных факторов малой токсичности на организм животных и человека является активное и пассивное табакокурение. В ранее опубликованных работах авторами исследован ряд морфологических и иммунологических параметров у пассивно куривших крыс. Настоящая работа продолжает исследование в данном направлении и посвящена анализу влияния синтетического пептида — препарата КК1, являющимся структурным аналогом первичной последовательности АКТГ (15–18) (Acetyl-(D-Lys)-Lys-Arg-Arg-amide), обладающего антиоксидантным и стресс-протекторным эффектом на фагоцитарную активность перитонеальных макрофагов и интенсивность свободно-радикального окисления в печени и сыворотке крови. Определение иммунологических и биохимических показателей проведено у 60 крысят от куривших и некуривших крыс Wistar. Беременные крысы подвергались воздействию табачного дыма (по 8 часов в день, с 1-го по 20-й день гестации). Контрольные группы получали физраствор, опытные — препарат КК1 (в дозе 40 мкг/кг, интраназально, пятикратно через день в течение 10 дней). У потомства на 21-й день жизни определяли фагоцитарные показатели, уровень циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК), активность печеночных ферментов (аланинаминотрансферазы (АЛТ), аспартатаминотрансферазы (АСТ)), маркеры окислительного стресса (малоновый диальдегид (МДА), диеновые конъюгаты (ДК)) и антиоксидантные ферменты (супероксиддисмутаза (СОД), каталаза). Показано, что пренатальное воздействие табачного дыма у крысят: снижало фагоцитарный показатель, но повышало метаболическую активность нейтрофилов, увеличивало активность АСТ в сыворотке крови, активировало свободнорадикальное окисление (повышение МДА, ДК) с одновременным угнетением естественных механизмов антирадикальной защиты (снижение СОД и каталазы). Использование препарата КК1 способствовало: нормализации фагоцитарных показателей, снижению активности АСТ и восстановлению антиоксидантной защиты. Выявленные изменения указывают в пользу антиоксидантных свойств препарата КК1 при пассивном курении крыс, что является одним из важных аспектов иммунопротекторного действия исследуемого вещества. Механизм действия препарата КК1 может быть связан с влиянием на текучесть синаптических мембран, модуляцией рецепторных функций, процессами фосфорилирования белков и избыточного синтеза цитокинов. Положительный эффект по

Адрес для переписки:

Кузьмичева Наталья Александровна
ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ
460000, Россия, г. Оренбург, ул. Советская, 6.
Тел.: 8 (987) 847-52-55.
E-mail: natalie-vip@list.ru

Address for correspondence:

Natalia A. Kuzmicheva
Orenburg State Medical University
6 Sovetskaya St
Orenburg
460000 Russian Federation
Phone: +7 (987) 847-52-55.
E-mail: natalie-vip@list.ru

Образец цитирования:

Н.А. Кузьмичева, А.И. Смолягин, Ю.В. Филиппова
«Анализ влияния препарата КК1 на иммунологические и биохимические параметры у крысят, рожденных от пассивно куривших крыс Wistar» // Российский иммунологический журнал, 2025. Т. 28, № 3. С. 541–546.
doi: 10.46235/1028-7221-17159-AOK

© Кузьмичева Н.А. и соавт., 2025
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

N.A. Kuzmicheva, A.I. Smolyagin, Yu.V. Filippova “Analysis of KK1 compound effects on immunological and biochemical parameters in prenatally tobacco-exposed rat Wistar offspring”, Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2025, Vol. 28, no. 3, pp. 541–546.
doi: 10.46235/1028-7221-17159-AOK

© Kuzmicheva N.A. et al., 2025
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.46235/1028-7221-17159-AOK

снижению продуктов свободно радикального окисления липидов и повышению активности каталазы подтверждает литературные данные об антиоксидантном и стресспротекторном действии препарата КК1. Препарат КК1 проявляет антиоксидантный и иммунопротекторный эффект, нормализуя негативные последствия пренатального воздействия табачного дыма у потомства крыс, что позволяет рекомендовать его использование при исследовании влияния факторов малой токсичности на организм экспериментальных животных.

Ключевые слова: пренатальное табакокурение, крысы, иммунологические показатели, биохимические показатели, маркеры окислительного стресса, препарат КК1, стресс-протекторы

ANALYSIS OF KK1 COMPOUND EFFECTS ON IMMUNOLOGICAL AND BIOCHEMICAL PARAMETERS IN PRENATALLY TOBACCO-EXPOSED RAT WISTAR OFFSPRING

Kuzmicheva N.A., Smolyagin A.I., Filippova Yu.V.

Orenburg State Medical University, Orenburg, Russian Federation

Abstract. Active and passive tobacco smoking is one of the widespread low-toxicity factors affecting animals and humans. In previous studies, the authors investigated morphological and immunological parameters in passively smoke-exposed rats. The aim of our study was to continue research in this direction focusing on the effects of a synthetic KK1 peptide, a structural analogue of the ACTH primary sequence (15-18) (Acetyl-(D-Lys)-Lys-Arg-Arg-amide) with antioxidant and stress-protective properties, on the phagocytic activity of peritoneal macrophages and intensity of free-radical oxidation in the liver and blood serum. Immunological and biochemical parameters were assessed in 60 pups from tobacco smoke-exposed and non-exposed Wistar rats. The pregnant rats were subjected to tobacco smoke (8 hours a day, from 1st to 20th day of gestation). Control groups received saline, while experimental groups were administered KK1 (intranasally, at a dose of 40 µg/kg, five times during the 10-day period). 21 days *postpartum*, the little rats were evaluated for phagocytic indices, circulating immune complex levels (CIC), hepatic enzyme activity (alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST)), oxidative stress markers (malondialdehyde (MDA), diene conjugates (DC), and antioxidant enzymes (superoxide dismutase (SOD), catalase). The study has shown that prenatal tobacco smoke exposure in rat offspring was associated with reduced phagocytic activity, but elevated neutrophil metabolic activity, increased serum AST activity, activated free radical oxidation (elevated MDA, DC), along with suppression of endogenous antioxidant defense mechanisms (decreased SOD and catalase). Administration of the KK1 compound was associated with normalized phagocytic indices, reduced AST activity and restored antioxidant defenses. These findings support the opinion on antioxidant properties of KK1 under passive smoking conditions, highlighting its immunoprotective effects. The effects of KK1 compound may be associated with modulation of synaptic membrane fluidity, regulation of receptor functions, protein phosphorylation processes, and suppression of excessive cytokine synthesis. The observed reduction in free-radical oxidation products and enhancement of catalase activity align with existing evidence of KK1's antioxidant and stress-protective efficacy. The KK1 compound has demonstrated antioxidant and immunoprotective effects by mitigating the adverse consequences of prenatal tobacco smoke exposure in rat offspring. These findings support its potential application in studies investigating the impact of low-toxicity environmental factors in experimental animal models.

Keywords: prenatal tobacco exposure, rat, immune response, biochemistry parameters, oxidative stress markers, KK1 compound, stress-protective activity

Введение

Несмотря на большое количество сообщений, посвященных влиянию различных экотоксикантов, по-прежнему представляет интерес исследование воздействия факторов малой токсичности на организм экспериментальных животных и человека и поиск средств для коррекции вы-

явленных нарушений. Одним из таких широко распространенных факторов является активное и пассивное табакокурение. Показано, что попадание табачного дыма в организм взрослых животных вызывает нарушение физиологических, биохимических, иммунологических параметров, одним из механизмов которых является актива-

ция свободно-радикального окисления липидов [7, 8, 13]. Вместе с тем менее изучены проблемы пренатального воздействия химических веществ на иммунологические и биохимические параметры у потомства от пассивно куривших животных. В связи с этим представляет интерес исследование новых препаратов, обладающих защитным эффектом при пренатальном воздействии экотоксикантов. Одним из таких веществ является синтетический пептид, структурный аналог первичной последовательности АКТГ (15-18) (Acetyl-(D-Lys)-Lys-Arg-Arg-amide), обладающий антиоксидантным эффектом и повышающий устойчивость к стрессу и гипоксии [10]. В ранее проведенных авторами работах [3, 4] показано негативное влияние пассивного табакокурения на иммунную систему беременных и небеременных самок крыс Wistar с оценкой иммуномодулирующего эффекта препарата КК1.

Целью данной работы являлся анализ влияния препарата КК1 на иммунологические и биохимические параметры у крысят, рожденных от пассивно куривших крыс Wistar.

Материалы и методы

Исследования были выполнены на 20 половозрелых самках крыс линии Wistar массой 200–220 г и на 60 крысятах массой 28–38 г в возрасте 21 день от рождения. Животных содержали в стандартных условиях вивария на стандартном пищевом рационе без ограничения доступа к воде. Эксперименты были проведены с учетом этических норм и рекомендаций по работы с лабораторными животными, отраженными в «Европейской Конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях» (Страсбург, 1986). Пептидный гомолог фрагмента АКТГ₁₅₋₁₈ (Lys-Lys-Arg-Arg) под лабораторным шифром КК-1 синтезирован в ФГУП «Гос. НИИ ОЧБ» ФМБА России и любезно предоставлен членом-корреспондентом РАН, профессором А.С. Симбирцевым.

Опытные крысы подвергались фумигации табачным дымом по 8 часов с 1-го по 20-й день беременности. Контрольные крысы в аналогичный период помещались в камеру, вентилируемую атмосферным воздухом без табачного дыма. Начиная со 2-й недели беременности контрольным крысам вводили: 1-я группа — физраствор (0,2 мл интраназально), 3-я группа — тетрапептид (в дозе 40 мкг/кг/сут 5 раз через день интраназально). Опытным курившим крысам вводили: 2-я группа — физраствор (0,2 мл интраназально), 4-я группа — тетрапептид (в дозе 40 мкг/кг/сут 5 раз через день интраназально). Родившиеся крысята были разделены на аналогичные 4 группы. Эвтаназию осуществляли дислокацией шейных

позвонков под эфирным наркозом на 21-е сутки после рождения.

В соответствии с рекомендациями [1] интенсивность фагоцитоза перитонеальных макрофагов оценивали по фагоцитарному показателю (ФП) и фагоцитарному индексу (ФИ) в отношении живой тест-культуры ($2,5 \times 10^8$ КОЕ/мл) стафилококка (штамм 209-Р) через 30 минут инкубации при 37°. Метаболическую активность перитонеальных макрофагов определяли в НСТ-тесте в спонтанном и стимулированном (зимозан) вариантах. Уровень ЦИК определяли в сыворотке крови с использованием ПЭГ-6000. Активность ферментов аланинаминотрансферазы (АЛТ) и аспартатаминотрансферазы (АСТ) определяли в сыворотке крови на автоматическом биохимическом анализаторе BioSystems А-25 (Испания) с помощью наборов BioSystems (Испания). В эритроцитарной массе оценивали активность антиоксидантных ферментов каталазы и супероксиддисмутазы (СОД). В гомогенате печени определяли содержание малонового диальдегида (МДА) и диеновых конъюгатов (ДК) [1]. Учитывая отсутствие нормального распределения результатов, которое оценивалось с помощью критерия Шапиро—Уилка, сравнение групп проводили используя непараметрический U-критерий Манна—Уитни при критическом уровне значимости $p < 0,05$. Результаты представлены в виде медианы и интерквартильного размаха — Me ($Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$).

Результаты и обсуждение

У крысят, родившихся от самок, подвергавшихся пассивному табакокурению во время беременности (2-я гр.), отмечалось снижение фагоцитарного показателя при неизменном фагоцитарном индексе (табл. 1). При введении КК1 беременным курившим крысам отмечалось небольшое увеличение фагоцитарных показателей по отношению к уровню животных опытной группы. Установлено повышение метаболической активности нейтрофилов у опытных животных (2-я гр.) в спонтанном НСТ-тесте (на 112%) и индуцированном НСТ (на 27%) по сравнению с крысятами контрольной группы. Использование препарата КК1 способствовало нормализации показателей спонтанного и индуцированного НСТ-теста у крысят 4-й опытной группы. В целом применение препарата КК1 способствовало нормализации измененных фагоцитарных показателей у опытных крысят.

Введение препарата КК1 некурящим крысам не изменяло содержание ЦИК по сравнению с уровнем контрольных крысят. Количество ЦИК у опытных крысят (2-я гр.) (54,5 (35–64,5) ед. оп.) и от пассивно куривших крыс, получающих пре-

ТАБЛИЦА 1. ВЛИЯНИЕ ПРЕПАРАТА КК1 НА ФАГОЦИТАРНУЮ И МЕТАБОЛИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ ПЕРИТОНЕАЛЬНЫХ МАКРОФАГОВ КРЫСЫ В ВОЗРАСТЕ 21 СУТОК, РОДИВШИХСЯ ОТ ПАССИВНО КУРИВШИХ КРЫС WISTAR, Ме ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

TABLE 1. EFFECT OF THE KK1 COMPOUND ON PHAGOCYTIC AND METABOLIC ACTIVITY OF PERITONEAL MACROPHAGES IN 21-DAY-OLD RAT BORN TO PASSIVELY SMOKE-EXPOSED WISTAR RATS, Ме ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

Показатели Indicators	1-я группа Group 1 (n = 15)	2-я группа Group 2 (n = 15)	3-я группа Group 3 (n = 15)	4-я группа Group 4 (n = 15)
Фагоцитарный показатель, % Phagocytic activity, %	43,5 (40,0-50,3)	33,5* (30,3-38,0)	38,0 (32,0-46,5)	36,0 (30,0-39,5)
Фагоцитарный индекс Phagocytic index	5,3 (4,8-8,8)	4,9 (4,0-5,5)	5,6 (4,8-7,3)	5,5 (4,7-6,7)
НСТ спонтанный, % Spontaneous NBT test, %	9,2 (9,0-10,2)	19,5* (16,5-22,4)	9,0 (8,0-11,5)	11,6 (8,1-16,9)
НСТ индуцированный, % Induced NBT test, %	31,5 (28,1-32,4)	40,5 (38,3-47,0)	30,0 (25,0-35,0)	34,6 (29,0-35,8)

Примечание. * – статистически значимые различия ($p < 0,05$) с показателями 1-й контрольной группы.

Note. *, significant differences ($p < 0.05$) from the control group 1.

ТАБЛИЦА 2. СОДЕРЖАНИЕ МДА (НМОЛЬ/МГ БЕЛКА) И ДК (ЕД. ОПТ. ПЛ./МГ БЕЛКА) В ПЕЧЕНИ И СЫВОРОТКЕ КРОВИ, АКТИВНОСТЬ АНТИОКСИДАНТНЫХ ФЕРМЕНТОВ В ЭРИТРОЦИТАХ КРЫС, Ме ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

TABLE 2. CONTENT OF MDA (NMOL/MG PROTEIN) AND DC (OD UNITS/MG PROTEIN) IN THE LIVER AND SERUM, ACTIVITY OF ANTIOXIDANT ENZYMES IN RAT ERYTHROCYTES, Ме ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

Показатели Indicators		1-я группа Group 1 (n = 12)	2-я группа Group 2 (n = 12)	3-я группа Group 3 (n = 12)	4-я группа Group 4 (n = 12)
Печень Liver	МДА MDA	0,89 (0,81-0,95)	1,13 (0,80-1,23)	0,92 (0,86-1,03)	0,94 (0,84-1,01)
	ДК DC	0,20 (0,16-0,24)	0,37* (0,34-0,41)	0,19 (0,14-0,21)	0,36* (0,33-0,37)
Сыворотка крови Serum	МДА MDA	8,9 (8,3-10,9)	10,5* (9,0-13,2)	8,72 (7,98-10,62)	8,95 (8,26-9,94)
	ДК DC	0,21 (0,18-0,26)	0,25 (0,15-0,38)	0,17 (0,16-0,25)	0,19 (0,17-0,24)
Эритроциты Erythrocytes	Каталаза, усл. ед./гНб Catalase, conv. units/gHb	268,0 (215,2-354,9)	185,7 (168,7-231,1)	217,8 (198,7-281,1)	216,6 (185,6-262,4)
	СОД, усл. ед./гНб SOD, conv. units/gHb	227 (178,5-273,5)	165 (141,2-241,1)	172,8 (159,3-183,3)	169,3 (167,5-175,4)

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. As for Table 1.

парат КК1 (4-я гр.) (55,5 (47-64,5) ед. оп.) в 2,5 раза превышало уровень ЦИК у крыс от контрольных животных (25,5 (17-45) ед. оп.).

Анализ активности АЛТ в сыворотке крови показал отсутствие значимых изменений данных показателей у животных всех исследуемых групп. Вместе с тем необходимо отметить тенденцию к повышению активности АСТ в 1,25 раза (417,7 (395,3-459,9) ед/л) у животных 2-й опытной группы, по сравнению с аналогичным параметром контрольной группы (332,4 (321,9-355,7) ед/л),

что может служить маркером развития патологии печени у животных, подвергавшихся воздействию пассивного табакокурения в эмбриональный период. Препарат КК1 снижал активность АСТ у крыс 4-й опытной группы (339,0 (323,3-362,8) ед/л) на 18% по сравнению со 2-й опытной группой.

Для выявления механизмов изменения изученных показателей на следующем этапе проведено определение интенсивности свободно-радикального окисления и активности ферментов

антиоксидантной защиты (табл. 2). У крысят, родившихся от самок, подвергнутых пассивному табакокурению наиболее выражено повышение ДК в печени (2-я и 4-я гр.), а также увеличение МДА в сыворотке крови (2-я гр.) по сравнению с контрольной группой животных. Введение препарата КК1 контрольным крысам не оказывало влияния на содержание МДА, ДК в печени и сыворотке крови потомства (3-я гр.). Использование КК1 у беременных куривших крыс способствовало уменьшению выраженности свободно-радикального окисления у их потомства. Содержание МДА в сыворотке крови крысят 4-й группы снижалось в 1,2 раза по сравнению со 2-й опытной группой и не отличалось от контрольной.

Одна из причин активации свободно-радикального окисления может быть связана с уменьшением активности антиоксидантных ферментов. Так, во 2-й опытной группе животных отмечалось снижение активности СОД и каталазы в 1,4 раза по сравнению с контрольной группой. При использовании КК1 у беременных куривших крыс 4-й группы наблюдалось увеличение активности каталазы в 1,17 раза по сравнению со 2-й опытной группой животных.

Таким образом, установлено, что пренатальное пассивное курение приводит к активации процессов свободного радикального окисления, с одновременным угнетением естественных механизмов антирадикальной защиты у потомства. Выявленные изменения указывают в пользу антиоксидантных свойств препарата КК1 при пассивном курении крыс, что является одним из важных аспектов иммунопротекторного действия исследуемого препарата.

При обсуждении результатов данной работы, важно учесть ранее полученные нами данные по

отрицательному воздействию пассивного курения на морфологические и иммунологические параметры самок крыс [5]. Можно полагать, что выявленные нарушения у крысят, родившихся от куривших самок, являются следствием стрессорной реакции, выражающейся в усилении процессов свободно-радикального окисления. Известно, что табачный дым способствует активации свободнорадикальных процессов с одновременным снижением эффективности антиоксидантных механизмов [12]. В свою очередь, усиление свободно-радикального окисления липидов лежит в основе изменений фагоцитарных показателей [9], которые могут быть связаны с повреждением клеточных структур и нарушением регуляции окислительно-восстановительных процессов [11]. Точный механизм действия препарата КК1 в настоящее время полностью не изучен, однако известно, что его эффекты могут быть связаны с влиянием на текучесть липидных мембран, модуляцию рецепторных функций, процессы фосфорилирования белков и избыточного синтеза цитокинов, что обеспечивает его стресс-протекторный эффект [6]. Выявленный положительный эффект по снижению продуктов перекисного окисления липидов и повышению активности каталазы подтверждает литературные данные [2, 10] об антиоксидантном и стресспротекторном действии препарата КК1.

Выводы

Препарат КК1 проявляет антиоксидантный и иммунопротекторный эффект, нормализуя негативные последствия пренатального воздействия табачного дыма у потомства крыс, что позволяет рекомендовать его использование при исследовании влияния факторов малой токсичности на организм экспериментальных животных.

Список литературы / References

1. Волчегорский И.А., Долгушин И.И., Колесников О.Л. Экспериментальное моделирование и лабораторная оценка адаптивных реакций организма. Челябинск, 2000. 167 с. [Volchegorsky I.A., Dolgushin I.I., Kolesnikov O.L. Experimental modeling and laboratory evaluation of adaptive reactions of the body]. Chelyabinsk, 2000. 167 p.
2. Кудина О.В., Штрыголь С.Ю., Колобов А.А. Влияние олигопептидов – гомологов фрагмента АКТГ [15-18] на показатели углеводного обмена в условиях острого холодового стресса // Вестник фармации, 2019. № 1 (83). С. 64-70. [Kudina O.V., Shtrygol S.Yu., Kolobov A.A. Influence of oligopeptides – homologues of the ACTH fragment [15-18] on the parameters of carbohydrate metabolism under conditions of acute cold stress. *Vestnik farmatsii = Vestnik Farmacii*, 2019, no. 1 (83), pp. 64-70. (In Russ.)]
3. Кузьмичева Н.А., Михайлова И.В., Пушкарева Л.А., Филиппова Ю.В., Бондаренко А.И., Синеговец А.А., Смолягин А.И. Влияние пептида КК1 на иммунологические параметры у пассивно куривших беременных крыс и их потомства // Российский иммунологический журнал, 2022. Т. 25, № 2. С. 227-234. [Kuzmicheva N.A., Mikhailova I.V., Pushkareva L.A., Filippova Y.V., Bondarenko A.I., Sinegovets A.A., Smolyagin A.I. Effect of the KK1 peptide on immunological parameters in passively smoking pregnant rats and their offspring. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2022, Vol. 25, no. 2, pp. 227-234. (In Russ.)] doi: 10.46235/1028-7221-1122-EOT.

4. Смолягин А.И., Колобов А.А., Кузьмичева Н.А., Полякова В.С., Михайлова И.В., Филиппова Ю.В., Мирошниченко И.В. Оценка влияния тетрапептидов КК1 и КК5 на иммунологические параметры селезенки крыс при пассивном табакокурении // Российский иммунологический журнал, 2024. Т. 27, № 3. С. 449-456. [Smolyagin A.I., Kolobov A.A., Kuzmicheva N.A., Polyakova V.S., Mikhailova I.V., Filippova Y.V., Miroshnichenko I.V. Effect of tetrapeptides KK1 and KK5 on the immunological parameters of rat spleen during passive smoking. *Rossiyskiy immunologicheskii zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2024, Vol. 27, no. 3, pp. 449-456. (In Russ.)] doi: 10.46235/1028-7221-16715-EOT.
5. Стадников А.А., Кузьмичева Н.А., Пушкарева Л.А., Ермолина Е.В., Михайлова И.В., Смолягин А.И. Иммуноморфологическая оценка беременных крыс, подвергшихся пассивному табакокурению, и их потомства (нейроэндокринные аспекты) // Журнал анатомии и гистопатологии, 2023. Т. 12, № 1. С. 64-71. [Stadnikov A.A., Kuzmicheva N.A., Pushkareva L.A., Ermolina E.V., Mikhailova I.V., Smolyagin A.I. Immunomorphological evaluation of pregnant rats exposed to passive smoking and their offspring (Neuroendocrine Aspects). *Zhurnal anatomii i gistopatologii = Journal of Anatomy and Histopathology*, 2023, Vol. 12, no. 1, pp. 64-71. (In Russ.)]
6. Халютин Д.А., Ховпачев А.А., Гребенюк А.Н., Рейнюк В.Л., Антушевич А.Е., Колобов А.А. Терапевтический эффект новых нейропептидов и гепатопротектора моликсан при острых отравлениях этанолом // Токсикологический вестник, 2015. № 2 (131). С. 10-17. [Halyutin D.A., Hovpachev A.A., Grebenyuk A.N., Reynyuk V.L., Antushevich A.E., Kolobov A.A. Therapeutic efficacy of new neuropeptides and hepatoprotector molixan at acute poisonings with ethanol. *Toksikologicheskii vestnik = Toxicological Review*, 2015, no. 2 (131), pp. 10-17. (In Russ.)]
7. Bauer-Kemény C., Herth F.J.F. Smoking-toxic substances and immunological consequences. *Radiologie (Heidelb)*, 2022, Vol. 62, no. 9, pp. 731-737. (In German)
8. Caliri A.W., Tommasi S., Besaratinia A. Relationships among smoking, oxidative stress, inflammation, macromolecular damage, and cancer. *Mutat. Res. Rev. Mutat. Res.*, 2021, Vol. 787, 108365. doi: 10.1016/j.mrrev.2021.108365.
9. Fialkow L., Wang Y., Downey G.P. Reactive oxygen and nitrogen species as signaling molecules regulating neutrophil function. *Free Radic. Biol. Med.*, 2007, Vol. 42, no. 2, pp. 153-164.
10. Kudina O., Shtrygol S., Larjanovska Y. Effect of oligopeptides-homologues of the fragment of ACTH 15-18 on morphogenetic markers of stress in the adrenal glands on the model of acute cold injury in rats. *Turk. J. Pharm. Sci.* 2023, Vol. 20, no. 2, pp. 100-107.
11. Mittal M., Siddiqui M.R., Tran K., Reddy S.P., Malik A.B. Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury. *Antioxid. Redox Signal.*, 2014, Vol. 20, no. 7, pp. 1126-1167.
12. Pizent A., Lazarus M., Kovačić J., Tariba Lovaković B., Brčić Karačonji I., Živković Semren T., Sekovanić A., Orct T., Branović-Čakanić K., Brajenović N., Jurić A., Miškulin I., Škratić L., Stasenکو S., Mioč T., Jurasović J., Piasek M. Cigarette smoking during pregnancy: effects on antioxidant enzymes, metallothionein and trace elements in mother-newborn Pairs. *Biomolecules*, 2020, Vol. 10, 892. doi: 10.3390/biom10060892.
13. Valko M., Leibfriz D., Moncol J., Cronin M.T., Mazur M., Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 2007, Vol. 39, no. 1, pp. 44-84.

Авторы:

Кузьмичева Н.А. — старший преподаватель кафедры фармацевтической химии ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Оренбург, Россия

Смолягин А.И. — д.м.н., профессор, заслуженный работник высшей школы РФ, профессор кафедры эпидемиологии и инфекционных болезней ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Оренбург, Россия

Филиппова Ю.В. — к.м.н., доцент кафедры фармацевтической химии ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Оренбург, Россия

Authors:

Kuzmicheva N.A., Senior Lecturer, Department of Pharmaceutical Chemistry, Orenburg State Medical University, Orenburg, Russian Federation

Smolyagin A.I., PhD, MD (Medicine), Professor, Honored Worker of Higher Education of the Russian Federation, Professor, Department of Epidemiology and Infectious Diseases, Orenburg State Medical University, Orenburg, Russian Federation

Filippova Yu.V., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Pharmaceutical Chemistry, Orenburg State Medical University, Orenburg, Russian Federation

Поступила 28.03.2025

Отправлена на доработку 03.04.2025

Принята к печати 25.05.2025

Received 28.03.2025

Revision received 03.04.2025

Accepted 25.05.2025

ТУЧНЫЕ КЛЕТКИ ЛЕГКИХ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ВОЗДЕЙСТВИИ ГЛИЦЕРИН-ПРОПИЛЕНГЛИКОЛЕВОЙ КУРИТЕЛЬНОЙ СМЕСИ

Арташян О.С.^{1,2}, Ярема О.П.²

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

² ФГАОУ ВО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина»,
г. Екатеринбург, Россия

Резюме. В последнее время помимо традиционных никотинсодержащих курительных смесей — табачных изделий или сигарет, стали популярны альтернативные методы курения, основанные на нагревании специальной жидкости — вейпа, содержащие глицерин и пропиленгликоль. Действие курительных смесей для вейпа на легкие на сегодняшний день остается неизученным. Возможно, в патогенезе этих процессов участвуют тучные клетки, как обязательный компонент микроокружения дыхательных путей. Цель работы — изучение влияния на тучные клетки легких крыс глицерин-пропиленгликолевой курительной смеси. Эксперимент был проведен на крысах линии Wistar. Животных помещали в ингаляционную камеру, где ежедневно по 1 часу в течение 3 месяцев крысы подвергались воздействию: никотинсодержащей курительной смеси (контроль), курительной смеси для вейпа (опытная группа); группа сравнения — интактные крысы. Гистологическими методами проводили оценку общего состояния легочной ткани, с помощью толудинового синего выявляли тучные клетки, с последующим их типированием. Рассчитывали коэффициент дегрануляции и средний гистохимический коэффициент. Статистическую обработку проводили с помощью критерия Манна—Уитни (* — при $p < 0,05$ — различия достоверны). Эксперимент показал, что после 3 месяцев воздействия в легких наблюдаются патологические изменения: фиброз стенок бронхов, лимфоцитарно-лейкоцитарные инфильтрации, образование булл, сладж-феномен в сосудах. Воздействие и никотинсодержащей и глицерин-пропиленгликолевой курительных смесей вызывает однонаправленные изменения в дыхательных путях, которые выражаются в развитии воспалительных процессов и ремоделировании тканей. При воздействии курительных смесей тучные клетки в легких неправильной формы, вытянутые или веретеновидные. Популяция тучных клеток в легких реагирует повышением функциональной активности, независимо от состава курительной смеси. Длительное воздействие глицерин-

Адрес для переписки:

Арташян Ольга Сергеевна
ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии»
Уральского отделения Российской академии наук
620049, Россия, г. Екатеринбург,
ул. Первомайская, 106.
Тел.: 8 (343) 374-00-70.
E-mail: artashyan@inbox.ru

Address for correspondence:

Olga S. Artashyan
Institute of Immunology and Physiology,
Ural Branch, Russian Academy of Sciences
106 Pervomayskaya St
Ekaterinburg
620049 Russian Federation
Phone: +7 (343) 374-00-70.
E-mail: artashyan@inbox.ru

Образец цитирования:

О.С. Арташян, О.П. Ярема «Тучные клетки легких при экспериментальном воздействии глицерин-пропиленгликолевой курительной смеси» // Российский иммунологический журнал, 2025. Т. 28, № 3. С. 547-552. doi: 10.46235/1028-7221-17137-MCO

© Арташян О.С., Ярема О.П., 2025
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

O.S. Artashyan, O.P. Yarema "Mast cells of the lungs during experimental exposure to glycerin-propylene glycol smoking mixture", Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2025, Vol. 28, no. 3, pp. 547-552. doi: 10.46235/1028-7221-17137-MCO

© Artashyan O.S., Yarema O.P., 2025
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.46235/1028-7221-17137-MCO

пропиленгликолевой курительной смеси приводит к увеличению числа общего количества тучных клеток, что расценивается как долгосрочная мера со стороны микроокружения, свидетельствующая о более весомом негативном влиянии данной курительной смеси.

Ключевые слова: тучные клетки, легкие, сигареты, вейп, курение

MAST CELLS OF THE LUNGS DURING EXPERIMENTAL EXPOSURE TO GLYCERIN-PROPYLENE GLYCOL SMOKING MIXTURE

Artashyan O.S.^{a, b}, Yarema O.P.^b

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

^b B. Yeltsin Ural Federal University, Ekaterinburg, Russian Federation

Abstract. Along with traditional nicotine-containing smoking mixtures (tobacco products or cigarettes), some alternative smoking methods have recently become popular. The latter are based on heating a special liquid, vape, containing glycerin and propylene glycol. The effect of smoking vaping mixtures on the lungs, to date, remains unexplored. Mast cells seem to be involved in pathogenesis of these processes, being an essential cellular component of respiratory tract environment. The aim of this work was to study the effect of glycerin-propylene glycol smoking mixture on rat lung mast cells. The experiment was conducted in Wistar rats. The animals were placed in an inhalation chamber, where the rats were exposed daily for 1 hour for 3 months to: nicotine—containing smoking mixture (control), smoking mixture for vaping (experimental group); comparison group — intact rats. Histological methods were used to assess general pathology of the lung tissue, with mast cells being detected by means of toluidine blue staining followed by their typing. The degranulation coefficient and the average histochemical coefficient were calculated. Statistical processing was performed using the Mann—Whitney criterion (*, at $p < 0.05$ — the differences are significant). The experimental series showed that, after 3 months of exposure, pathological changes are observed in the lungs: fibrosis of the bronchial walls, lymphocytic-leukocytic infiltrations, bull formation, and a vascular sludge phenomenon. Exposure to both nicotine-containing and glycerin-propylene glycol smoking mixtures caused unidirectional changes in the respiratory tract, which are expressed as development of inflammatory processes and tissue remodeling. When exposed to smoking mixtures, mast cells in the lungs are irregularly shaped, elongated or fusiform. The mast cell population in the lungs responds to the exposure by increasing functional activity, regardless of the composition of the smoking mixture. Prolonged exposure to a glycerin-propylene glycol smoking mixture leads to an increase in the total number of mast cells, which is regarded as a long-term response from the microenvironment, suggesting a more significant negative effect of this smoking mixture.

Keywords: mast cells, lungs, cigarettes, vape, smoking

Работа выполнена в рамках государственного задания ИИФ УрО РАН (Регистрационный номер НИОКТР № 122020900136-4) с использованием оборудования ЦКП ИИФ УрО РАН.

Введение

Употребление табака является вторым по значимости фактором риска, ведущим к смертности и инвалидизации, для мужчин и шестым для

женщин на 2019 год [5]. Тем не менее в России на 2022 год, по данным Всероссийского центра изучения общественного мнения, курит 33% граждан, то есть порядка 48,5 миллиона человек.

В последнее время, помимо традиционных никотинсодержащих курительных смесей (НКС) — табачных изделий или сигарет, стали популярны методы курения, основанные на нагревании специальной жидкости, превращающих ее в аэрозоль, который и вдыхает человек.

Жидкости всегда в своей основе имеют растворители (глицерин, пропиленгликоль), к ним дополнительно добавляют ароматизаторы и никотин, однако есть и безникотиновые смеси. Устройства, работающие по такому принципу, получили название вейп (от англ. vapour «пар»), или электронные сигареты. Вейп активно рекламируется как безопасная замена сигаретам или вспомогательное средство для отказа от курения, хотя на сегодняшний день, по данным ВОЗ, нет убедительных данных об эффективности такой «терапии». Люди употребляют вейп ради развлечения, вкуса, эксперимента, замены обычных сигарет и из-за социального давления [4]. В силу большого разнообразия электронных сигарет и составов курительных смесей (КС) для них влияние вейпа на дыхательную систему и организм человека до конца не исследовано. Существуют данные о крайне неблагоприятном влиянии КС для вейпа (ВКС) на человека, включая и летальные исходы [2, 3]. Возможную роль в этих процессах играют тучные клетки (ТК) легких, как обязательный компонент их микроокружения. Как известно, ТК участвуют в развитии патологических воспалительных процессов и в ремоделировании тканей. **Цель работы** — изучение влияния на ТК легких крыс глицерин-пропиленгликолевой ВКС.

Материалы и методы

Исследование проводилось на самках крыс линии Wistar, в возрасте 4 месяцев. Животные были получены из вивария ИИФ УрО РАН. Все животные предварительно прошли карантин. Животных помещали в ингаляционную камеру, где ежедневно по 1 часу в течение 3 месяцев крысы подвергались воздействию следующих КС: в качестве контроля — НКС — табачный дым, 60 мг/м³, n = 9; КС для вейпа (ВКС) — 30% пропиленгликоль / 70% глицерин, 20 мг/м³, n = 9. Группа сравнения — интактные крысы (ИК), n = 9. По окончании каждой серии экспериментов собирался гистологический материал легких. Выведение животных из эксперимента производилось спустя 12 недель после начала путем пероральной дачи диэтилового эфира.

Для оценки морфофункционального состояния тканей легких и популяции ТК были проведены гистологические исследования легких. По стандартной схеме изготавливали препараты для дальнейшего микроскопирования. Было выполнено окрашивание гематоксилином и эозином, также проводилось окрашивание толуидиновым синим для идентификации ТК. Легкие исследовались на наличие патологических признаков: наличие фиброза, клеточных инфильтраций,

слизистых комплексов в сосудах, оценивалось количество сосудов и форма альвеол. Также подсчитывали количество ТК, оценивали их морфологию и локализацию. ТК типировали по содержанию гранул в цитоплазме, характеру их распределения и дегрануляции. Определяли синтетическую активность, вычисляя средний гистохимический коэффициент (СГК), и дегрануляционную активность, вычисляя коэффициент дегрануляции (КД) [1].

Математический анализ и статистическая оценка результатов производились в программах STATISTICA 13.3, StatSoft Inc., IBM SPSS Statistics 25 (США) и при помощи языка программирования R. Для оценки достоверности различий между данными использовался критерий Манна–Уитни, различия считались достоверными при $p < 0,05$. Для оценки достоверности корреляции между данными был использован критерий Спирмена, корреляции считались достоверными при $p < 0,05$. Для исключения ошибок первого рода при исследовании корреляции был использован метод Бенджамина–Хохберга, данные считались достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Длительное воздействие НКС и ВКС вызывает однонаправленные изменения, которые приводят к развитию воспалительного процесса и структурным перестройкам ткани легких (табл. 1). В группе с воздействием ВКС данные изменения носят более выраженный характер, по сравнению с группой, подвергавшейся действию НКС. Вероятно, это происходит в результате того, что компоненты пара ВКС конденсируются на дыхательных путях и являются длительное время раздражающим фактором.

ТК дыхательных путей характеризуются большой гетерогенностью из-за обилия различных анатомических областей и сред. В ходе работы была изучена популяция ТК соединительнотканного типа в легких экспериментальных животных. Эти клетки более долгоживущие, по сравнению с ТК слизистого типа, и играют значительную регуляторную роль, участвуют в поддержании гомеостаза.

В норме в легких крыс ТК овальные или округлые по форме, чаще встречаются клетки с бледной окраской с малой насыщенностью гранулами. У экспериментальных животных клетки по форме встречаются удлиненные или сильно вытянутые. В локализации между группами не было выявлено существенных различий. ТК встречаются около кровеносных сосудов, в стенках

ТАБЛИЦА 1. ОЦЕНКА ИЗМЕНЕНИЙ ЛЕГОЧНОЙ ТКАНИ, ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ПОПУЛЯЦИИ ТК ЛЕГКИХ КРЫС ПОСЛЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ КС И ОЦЕНКА КОРРЕЛЯЦИИ МЕЖДУ ДАННЫМИ ПАРАМЕТРАМИ

TABLE 1. ASSESSMENT OF CHANGES IN LUNG TISSUE, FUNCTIONAL ACTIVITY OF THE RAT LUNG MC POPULATION AFTER EXPOSURE OF SM AND ASSESSMENT OF THE CORRELATION BETWEEN THESE PARAMETERS

Оцениваемый признак / Evaluated feature	ИК / IR	НКС / NSM	ВКС / VSM				
Процентная выраженность изменения формы альвеол, % Percentage severity of alveolar shape changes, %	0	40,00*±12,14	25,00*±13,33				
Толщина стенки бронха, мкм Bronchial wall thickness, μM	23,88±4,90	51,50*±17,45	74,60*±14,48				
Площадь клеточной инфильтрации, мм²/1 мм² Area of cellular infiltration, mm²/1 mm²	0,0006±0,0005	0,0036*±0,0086	0,0239*. **±0,0050				
Количество участков инфильтрации, шт/1 мм² Number of infiltration sites in 1 mm²	0,1156±0,0130	0,4839*±0,1960	0,4688*±0,1100				
Процентная выраженность сладж-комплексов, % Percentage of sludge complexes, %	0,00±3,58	43,0*±20,1	57,00*±11,83				
Количество средних сосудов (d = 20-70 мкм), шт/1 мм² Number of medium vessels (d = 20-70 μM) in 1 mm²	0,38±0,11	0,82*±0,19	0,65±0,13				
Количество мелких сосудов (d = 0-20 мкм), шт/1 мм² Number of small vessels (d = 0-20 μM) in 1 mm²	1,68±0,34	2,70*±0,74	2,26±0,38				
Общее количество ТК, шт/0,1 мм² Total number of MC in 0.1 mm²	5,66±3,98	5,66±3,69	9,43*. **±3,53				
Значение СГК Value of AHC	1,01±0,09	1,45*±0,19	1,55*±0,12				
Значение КД Value of CD	0,58±0,03	0,84*±0,04	0,85*±0,03				
Оценка корреляции между изменениями в легких и активностью ТК Evaluation of the correlation between changes in the lungs and MC activity							
Параметр / Parameter	Коэффициент корреляции / Correlation coefficient						
СГК ТК / AHC of MC	–	0,68	–	0,64	0,60	–	–
Параметр изменения легочной ткани Parameter of lung tissue change	Изменение формы альвеол Alveolar shape change	Площадь участков инфильтрации Area of the infiltration sites	Количество участков инфильтрации Number of the infiltration sites	Фиброз стенки бронха Bronchial wall fibrosis	Наличие сладж-комплексов Presence of sludge complexes	Количество средних сосудов Number of medium vessels	Количество мелких сосудов Number of small vessels
КД ТК / CD of MC	0,69	0,50	0,65	0,48	0,54	0,54	0,51

Примечание. Значения представлены медианами с абсолютным медианным отклонением. * – значения группы достоверно отличаются от значений группы ИК, по критерию Манна–Уитни $p < 0,05$; ** – значения группы достоверно отличаются от значений группы НКС, по критерию Манна–Уитни $p < 0,05$.

Note. The values are represented by medians with an absolute median deviation. *, the values of the group significantly differ from the values of the IR group; according to the Mann–Whitney criterion, $p < 0.05$; **, the values of the group significantly differ from the values of the NSM group; according to the Mann–Whitney criterion, $p < 0.05$.

бронхов, в плевре, реже наблюдаются в паренхиме легких.

Общая синтетическая активность достоверно увеличивается и в группе НКС, и в группе ВКС по сравнению с ИК. Дегрануляционная активность также значительно увеличивается в обеих экспериментальных группах. Увеличение же общего количества ТК фиксируется лишь в группе ВКС, что может свидетельствовать о более сильном негативном воздействии данной КС на ткани дыхательных путей.

Вышеприведенные морфометрические данные свидетельствуют о функциональной активации ТК в ответ на негативное воздействие НКС и ВКС. ТК начинают интенсивно формировать гранулы с медиаторами, выделять их в межклеточное пространство. Последние, через воздействие на клетки-мишени, играют роль в формировании структурных изменений в легких, которые касаются микроциркуляторного русла, иммунных и соединительнотканых компонентов. Эта гипотеза была подтверждена проведенным корреляционным анализом (табл. 1). Можно говорить о существовании корреляции между развитием патологических процессов в легких и активностью ТК при воздействии КС. Увеличение SGK коррелирует с увеличением толщины бронхов, а увеличение КД — практически со всеми изменениями в легочной ткани.

ТК, через выделение соответствующих медиаторов, влияют на наблюдаемые морфологические изменения легочной ткани (рис. 1, см. 3-ю стр. обложки). Так, одно из главных веществ ТК гистамин, а также химаза, триптаза, VEGF, способствуют расширению сосудов, увеличению проницаемости капилляров и ангиогенезу. Увеличение количества сосудов наблюдается в обеих экспериментальных группах. Секретируемые ТК PAF, PDGF вызывают активацию тромбоцитов, что способствует возникновению агрегации эритроцитов и других форменных элементов (сладж-феномену). Увеличение проницаемости позволяет иммунным клеткам проще проникать

в ткани. Протеазы ТК усиливают рекрутинг лейкоцитов. Интерлейкины (IL-1, IL-2, IL-3, IL-5, IL-15 и др.), TNF α , лейкотриен B₄, продуцируемые ТК, имеют провоспалительный характер действия, привлекают гранулоциты, способствуют пролиферации и активации иммунных клеток. Так, мы отмечаем значительно большие по площади, в сравнении с островками лимфоидной ткани бронхов (BALT) интактных животных, очаги лимфоцитарно-лейкоцитарной инфильтрации при воздействии ВКС. В развитии фиброза также играют роль ТК — фактор роста TGF- β , IL-6, выделяемые ими, стимулируют пролиферацию фибробластов и отложение коллагена [6]. Таким образом, большинство медиаторов ТК усиливают патологические изменения, наступающие при длительном воздействии КС.

Выводы

1. Воздействие и никотинсодержащей, и глицерин-пропиленгликолевой КС вызывает однонаправленные изменения в дыхательных путях, которые выражаются в развитии воспалительных процессов и ремоделировании тканей легких.

2. Популяция ТК в легких реагирует повышением функциональной активности независимо от состава курительной смеси. Однако длительное воздействие глицерин-пропиленгликолевой курительной смеси приводит еще и к увеличению числа ТК в ткани, что может расцениваться как долгосрочная мера со стороны микроокружения, свидетельствующая о более весомом негативном влиянии данной курительной смеси.

Благодарности

Выражаем благодарности Евгению Романовичу Федотикову за помощь в проведении эксперимента и конструирование ингаляционной камеры.

Список литературы / References

1. Юшков Б.Г., Черешнев В.А., Климин В.Г., Арташян О.С. Тучные клетки. Физиология и патофизиология. М.: Медицина, 2011. 237 с. [Yushkov B.G., Chereshev V.A., Klimin V.G., Artashyan O.S. Mast cells. Physiology and pathophysiology]. Moscow: Meditsina, 2011. 237 p.
2. Adhikari R., Koritala T., Gotur R., Malayala S.V., Jain N.K. EVALI – E-Cigarette or Vaping Product Use-Associated Lung Injury: A Case Report. *Cureus*, 2021, Vol. 13, no. 2, e13541. doi: 10.7759/cureus.13541.
3. Belok S.H., Parikh R., Bernardo J., Kathuria H. E-cigarette or vaping, product-use associated lung injury: a review. *Pneumonia*, 2020, Vol. 12, 12. doi: 10.1186/s41479-020-00075-2.
4. Evans-Polce R.J., Patrick M.E., Lanza S.T., Miech R.A., O'Malley P.M., Johnston L.D. Reasons for Vaping Among U.S. 12th Graders. *J. Adolesc. Health*, 2018, Vol. 62, no. 4, pp. 457-462.

5. Murray C.J.L., Aravkin A.Y., Zheng P., Abbafati C., Abbas K.M., Abbasi-Kangevari M., Abdollahpour I. Global burden of 87 risk factors in 204 countries and territories, 1990–2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *Lancet*, 2020, Vol. 396, no. 10258, pp. 1223–1249.
6. Okayama Y., Ra C., Saito H. Role of mast cells in airway remodeling. *Curr. Opin. Immunol.*, 2007, Vol. 19, no. 6, pp. 687–693.

Авторы:

Арташян О.С. — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории иммунофизиологии и иммунофармакологии ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук; доцент департамента биологии и фундаментальной медицины ФГАОУ ВО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина», г. Екатеринбург, Россия

Ярема О.П. — магистрант департамента биологии и фундаментальной медицины ФГАОУ ВО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина», г. Екатеринбург, Россия

Authors:

Artashyan O.S., PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratory of Immunophysiology and Immunopharmacology, Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences; Associate Professor, Department of Biology and Fundamental Medicine, B. Yeltsin Ural Federal University, Ekaterinburg, Russian Federation

Yarema O.P., Master's Student, Department of Biology and Fundamental Medicine, B. Yeltsin Ural Federal University, Ekaterinburg, Russian Federation

Поступила 25.03.2025
Отправлена на доработку 27.03.2025
Принята к печати 25.05.2025

Received 25.03.2025
Revision received 27.03.2025
Accepted 25.05.2025

ОЦЕНКА ИЗМЕНЕНИЙ ПРОФИЛЕЙ МЕТАБОЛИТОВ В КЛЕТКАХ МИКРОГЛИИ SIM-A9 ПОД ДЕЙСТВИЕМ ГИПОКСИИ И ЛИПОПОЛИСАХАРИДА

Бобров М.Ю., Никитин В.С., Бурак М.Ю., Афонин М.Б.

АНОО ВО «Научно-технологический университет «Сириус»», пгт Сириус, Краснодарский край, Россия

Резюме. В развитии нейровоспаления ведущую роль играют клетки микроглии. Активация микроглии приводит к формированию реактивных фенотипов, которые могут как способствовать развитию нейровоспаления, так и обеспечивать его разрешение. При активации микроглии происходит метаболическое репрограммирование или изменение активности путей метаболизма и содержания метаболитов, поддерживающих тот или иной фенотип. Возможность фенотипического переключения за счет метаболомного репрограммирования может иметь несомненный терапевтический потенциал, однако в настоящее время имеются ограниченные данные об изменении состава метаболитов и активности метаболических путей в клетках микроглии под действием нейровоспалительных факторов. В этой связи целью данной работы явилось проведение нетаргетного метаболомного исследования для оценки изменений профилей метаболитов в клетках линии микроглии SIM-A9 подвергнутых гипоксии, а также при активации TLR4. Профилирование метаболитов в экстрактах клеток, подвергнутых действию гипоксии или липополисахарида проводили с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии и масс-спектрометрии высокого разрешения, с последующим биоинформатическим анализом данных. Результаты проведенных исследований свидетельствуют о том, что гипоксическое воздействие, а также стимуляция TLR4 приводят к заметным перестройкам метаболизма клеток микроглии. При этом характер данных перестроек зависит от типа стрессорного воздействия и его длительности. Изменение активности путей метаболизма глутатиона и аргинина может служить маркером поляризации клеток микроглии после гипоксического воздействия. Активация TLR4 под действием липополисахарида приводит к модулированию путей, ассоциированных с энергетическим обменом, а также изменению путей метаболизма ароматических аминокислот. Можно заключить, что использованный в данной работе подход позволит в дальнейшем исследовать динамику метаболических изменений под действием провоспалительных факторов различной природы и детализировать их роль в метаболическом репрограммировании клеток микроглии на различных этапах развития нейровоспаления.

Ключевые слова: нейровоспаление, гипоксия, микроглия, метаболомика, профилирование метаболитов, масс-спектрометрия

Адрес для переписки:

Бобров Михаил Юрьевич
АНОО ВО «Научно-технологический университет
«Сириус»»
354349, Россия, Краснодарский край, пгт Сириус,
Олимпийский пр., 1.
Тел.: 8 (903) 251-86-77.
E-mail: bobrov.my@talantiuspeh.ru

Address for correspondence:

Mikhail Yu. Bobrov
Sirius University of Science and Technologies
1 Olympic Ave
Sirius settlement, Krasnodar Region
354349 Russian Federation
Phone: +7 (903) 251-86-77.
E-mail: bobrov.my@talantiuspeh.ru

Образец цитирования:

М.Ю. Бобров, В.С. Никитин, М.Ю. Бурак,
М.Б. Афонин «Оценка изменений профилей
метаболитов в клетках микроглии SIM-A9
под действием гипоксии и липополисахарида»
// Российский иммунологический журнал, 2025. Т. 28,
№ 3. С. 553-560.
doi: 10.46235/1028-7221-17212-EOC

© Бобров М.Ю. и соавт., 2025

Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

M. Yu. Bobrov, V. S. Nikitin, M. Yu. Burak, M. B. Afonin
“Evaluation of changed metabolite profiles in SIM-A9
microglial cells under the influence of hypoxia and
lipopolysaccharide”, Russian Journal of Immunology/
Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2025, Vol. 28, no. 3,
pp. 553-560.
doi: 10.46235/1028-7221-17212-EOC

© Bobrov M. Yu. et al., 2025

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

DOI: 10.46235/1028-7221-17212-EOC

EVALUATION OF CHANGED METABOLITE PROFILES IN SIM-A9 MICROGLIAL CELLS UNDER THE INFLUENCE OF HYPOXIA AND LIPOPOLYSACCHARIDE

Bobrov M.Yu., Nikitin V.S., Burak M.Yu., Afonin M.B.

Sirius University of Science and Technologies, Sirius settlement, Krasnodar Region, Russian Federation

Abstract. Microglial cells play a leading role in development of neuroinflammation. Activation of microglia leads to the formation of reactive phenotypes that can both contribute to the development of neuroinflammation and ensure its relief. Microglia activation is accompanied by metabolic reprogramming or changes in the metabolic pathways activity and the content of specific metabolites supporting a particular phenotype. An opportunity of phenotype switching due to metabolomic reprogramming may have real therapeutic potential. However, currently there are limited data on changes in composition of metabolites and activity of metabolic pathways in microglial cells under the influence of neuroinflammatory factors. In this regard, the purpose of this work was to conduct a non-targeted metabolomic study to assess changes of metabolites profiles in microglial cell line SIM-A9 exposed to hypoxia, as well as during TLR4 activation. Metabolite profiling of cell extracts exposed to hypoxia or lipopolysaccharide was performed using high-performance liquid chromatography and high-resolution mass spectrometry, followed by bioinformatics analysis of the data. The performed studies have shown that hypoxia, as well as TLR4 stimulation, lead to noticeable changes in the metabolism of microglial cells. At the same time, the nature of these changes depends on the type of stress exposure and its duration. Changed activity of glutathione and arginine metabolic pathways may serve as a marker of the polarization of microglial cells after hypoxic exposure. The activation of TLR4 by lipopolysaccharide leads to modulation of pathways associated with energy metabolism, as well as changes in the metabolic pathways of aromatic amino acids. One may suggest that the analytic approach used in this work will allow us to further investigate the dynamics of metabolic changes under the influence of proinflammatory factors of various origin and to gain detailed data on their role in metabolic reprogramming of microglial cells at various stages of neuroinflammation.

Keywords: neuroinflammation, hypoxia, microglia, metabolomics, metabolite profiling, mass spectrometry

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда № 24-25-20146.

Введение

Нейровоспаление является одним из ключевых патогенетических факторов повреждения тканей мозга, при гипоксии-ишемии, травме и нейродегенеративных процессах различного генеза. В развитии нейровоспаления ведущую роль играют клетки микроглии, которые являются резидентными макрофагами нервной ткани. Под действием патологических факторов микроглия приобретает реактивные фенотипы, которые могут как способствовать развитию нейровоспаления, так и сдерживать этот процесс, оказывая нейрозащитное действие [6]. Активация клеток микроглии приводит к морфологическому и функциональному разделению на два условных фенотипа: провоспалительный и противовоспалительный [11]. Регуляция баланса между формированием соответствующих фенотипов является одним из ключевых факторов, опреде-

ляющих глубину поражения нервной ткани под действием нейродеструктивных процессов, в частности при гипоксии-ишемии мозга.

Одним из факторов развития указанных фенотипов микроглии является метаболическое репрограммирование или изменение активности метаболических путей для того, чтобы сбалансировать потребность в энергии и строительных блоках в соответствующих условиях [9]. В ряде работ было установлено, что в условиях гипоксии-ишемии указанные фенотипы характеризуются специфическими перестройками метаболизма глюкозы, жирных кислот и ряда аминокислот. Также активно обсуждается роль метаболитов в формировании специфических фенотипов и возможности управления ими за счет модулирования метаболических путей [13]. В этой связи фенотипическое переключение микроглии может иметь несомненный терапевтический потенциал, однако детальные механизмы регуляции данного процесса с участием различных метаболитов остаются мало изученными.

При гипоксии-ишемии клетки микроглии одни из первых реагируют на повреждения

нервной ткани. Выделяющиеся при разрушении клеток молекулярные паттерны повреждения (DAMPs) запускают активацию микроглии. Среди мишеней DAMPs выделяют Toll-подобные рецепторы (TLR), которые являются молекулами первой линии для инициации врожденных иммунных реакций [1]. Было показано, что TLR4 присутствует на клетках микроглии и его экспрессия повышается в условиях гипоксии, что может стимулировать процессы нейровоспаления за счет активации транскрипционного активатора NF- κ B и усиления высвобождения провоспалительных цитокинов [8, 10, 14]. Таким образом, данные рецепторы играют ключевую роль в развитии нейровоспаления, однако их вклад в возможные метаболические перестройки остается до конца не изученным.

Для исследования клеточного метаболизма в последнее время активно используются технологии современной метаболомики. В частности, применение методов масс-спектрометрии позволяет проводить профилирование большого количества метаболитов для комплексной оценки изменений клеточного метаболома [12], что также может способствовать выявлению новых метаболических паттернов, участвующих в процессах нейровоспаления.

В настоящее время имеются ограниченные данные об изменении состава метаболитов и активности метаболических путей в клетках микроглии под действием нейровоспалительных факторов. В этой связи, целью данной работы явилось проведение нетаргетного метаболомного исследования для оценки изменений профилей метаболитов в клетках микроглии, подвергнутых гипоксии, а также при активации TLR4.

Материалы и методы

Для проведения метаболомных исследований в работе использовались клетки линии микроглии SIM-A9 (ATCC CRL-3265), которая была получена в результате спонтанной трансформации клеток микроглии коры головного мозга мышей линии C57Bl/6. Клетки культивировали в среде DMEM, содержащей аланил-глутамин 200 мМ, HEPES 10 мМ, пеницилин-стрептомицин 0,5%, и 10% эмбриональной телячьей сыворотки. Клетки инкубировали при 37 °C, в присутствии 5% CO₂. Для метаболомных исследований клетки пересеивали в 6-луночный планшет, 1 × 10⁶ клеток на лунку. На следующий день клетки подвергались гипоксии или инкубировались в присутствии липополисахарида. Гипоксию проводили в миниинкубаторе, соединенном с модулем регулируемой подачи газов (OkoLab) при температуре 37 °C. Для этого клеточные сре-

ды удаляли, клетки промывали раствором Хэнкса без глюкозы и далее инкубировали в этом растворе в условиях гипоксии (O₂ 1%) 30 мин или 1 час. Далее клетки возвращали в кондиционированные среды и проводили реоксигенацию 1 и 3 часа. Клетки также инкубировали в присутствии липополисахарида (LPS) 100 нг/мл в течение 1 и 3 часов. После стрессорных воздействий проводили экстракцию метаболитов. Для этого клетки промывали фосфатно-солевым буферным раствором, затем добавляли 800 мкл ледяной смеси метанол/вода (80/20). Клетки снимали скребком, после чего полученную суспензию переносили в пробирки, тщательно перемешивали и помещали в ультразвуковую баню на 20 секунд, затем помещали в лед. Манипуляции повторяли три раза. Далее клеточный дебрис осаждали центрифугированием 20 минут, 20 000 g при 4 °C. Супернатант переносили в новые пробирки и лиофилизировали в вакуумном концентраторе при температуре 45 °C, после чего добавляли 40 мкл 80% метанола в воде.

Профили метаболитов получали в результате анализа образцов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием молекулярных ионов. Для этого использовали хроматографическую систему (UltiMate 3000, Thermo Scientific, США), сопряженную с квадруполь-времяпролетным масс-спектрометром высокого разрешения (Bruker maXis II 4G ETD). Хроматографию проводили на колонке ACE Excel 100 × 2,1 мм 1,7 мкм C18-PFP EXL-1710-1002U с предколонкой Waters ACQUITY UPLC Peptide CSH C18 VanGuard Pre-column, 130Å, 1,7 мкм, 2,1 мм × 5 мм. В качестве подвижной фазы «А» использовалась деионизованная вода, подвижной фазы «В» — ацетонитрил. Обе фазы содержали в качестве модификатора 0,1% муравьиной кислоты. Элюирование производилось в градиенте подвижной фазы «В» при скорости потока 350 мкл/мин: 0-3 мин — 2%, 3-13 мин градиент 2-95%; 13-14,8 мин — 95% фазы «В», 14,8-15 мин — 2% фазы «В», после чего в течение 1 минуты возвращалась исходная концентрация фазы «В». Масс-спектры получали при разрешении 50 000 в диапазоне 50-1500 m/z, в режиме положительных ионов.

Детектирование пиков, их группировка и корреляция времени удерживания проводилась с помощью программного пакета MARS (Molecular Analysis of Retention Systems, Discovery Ltd, Великобритания). Для поиска и визуализации наибольших различий между группами сравнения использовали метод многомерной статистики — дискриминантный анализ ортогональных частичных наименьших квадратов (OPLS-DA) с помощью пакета программ плат-

формы Metaboanalyst v6.0 (www.metaboanalyst.ca). В данной работе проводилось нетаргетное метаболомное исследование, поэтому полученные после предобработки данные также анализировались с помощью алгоритма mummichog на платформе сервисов MetaboAnalyst 6.0 для обогащения метаболических путей по молекулярным ионам, внесшим вклад в формирование отличий между группами сравнения. Даже при высокой точности определения массы, обеспечиваемой современными платформами масс-спектрометрии высокого разрешения, зачастую невозможно однозначно идентифицировать соединение, основываясь только на отношении его массы к заряду. Чтобы обойти эту проблему, ключевой концепцией является смещение анализа с отдельных соединений на пути или группу функционально родственных соединений, то есть наборов метаболитов. Общее предположение концепции состоит в том, что поведение группы более устойчиво к определенной степени случайных ошибок для отдельных компонентов. Алгоритм mummichog является первой реализацией этой концепции, позволяющей сделать вывод об активности путей по ранжированному списку пиков молекулярных ионов, идентифицированных с помощью нецелевой метаболомики, с учетом времен хроматографического разделения [5]. Оригинальный алгоритм реализует метод анализа перепредставленности для оценки обогащения на уровне путей на основе значимых признаков. Если набор признаков содержал соединения с несколькими вариантами идентификации, для каждого варианта идентификации создавались новые наборы переменных, каждый из которых содержал один из вариантов. В этом случае пути считались статистически значимыми, если p было меньше 0,1 для каждого набора соединений. Значения обогащения и вероятность наблюдения усреднялись по всем наборам, и вычислялось медианное значение количества соединений в каждом пути. Идентификация соединений проводилась по базам данных KEGG (www.genome.jp). В результате выполнения алгоритма по соответствующему набору данных формируется список обогащенных путей, включающий информацию об общем количестве известных метаболитов в пути, количестве идентифицированных метаболитов пути в данном наборе данных и значимости обогащения с использованием критерия Фишера.

Анализ экспрессии цитокинов TNF и IL-6 проводили методом ПЦР в реальном времени. Для выделения тотальной РНК, проведения обратной транскрипции и постановки ПЦР использовали коммерческие наборы компании Evrogen. Данные по кратности изменения экспрессии по-

лучали методом дельта-дельта Ct, с использованием в качестве референса ген HPRT.

Результаты и обсуждение

Инкубация клеток микроглии в условиях гипоксии в течение 1 часа с последующей реоксигенацией в течение 3 часов приводили к заметному усилению экспрессии TNF и IL-6 (рис. 1А). При нахождении в условиях гипоксии в течение 30 мин с последующей реоксигенацией 1 и 3 часа, изменений в экспрессии обоих цитокинов не наблюдалось (данные не приведены). Стимуляция LPS в течение 1 и 3 часов также приводила к повышению экспрессии TNF и IL-6 (рис. 1А). Полученные данные свидетельствуют об активации клеток микроглии под воздействием используемых стрессорных факторов. Временные интервалы активации клеток были учтены при профилировании метаболитов.

Далее проводили оценку изменения профилей метаболитов в клетках микроглии под воздействием гипоксии и LPS. Обработка данных ВЭЖХ-МС анализа клеточных экстрактов методом многомерной статистики (OPLS-DA) выявила четкую кластеризацию в группах сравнения (рис. 1Б). Данные свидетельствуют о том, что гипоксическое воздействие и стимуляция LPS приводят к существенным изменениям в профилях метаболитов, в сравнении с интактными контролями. Далее полученные профили молекулярных ионов использовали для обогащения метаболических путей. Результаты обогащения по всем группам сравнения приведены в таблице 1. В таблице указаны названия обогащенных путей, общее количество метаболитов в пути, количество идентифицированных метаболитов и значение вероятности принятия нулевой гипотезы, полученное с использованием критерия Фишера. В условиях гипоксии продолжительностью 30 мин наиболее вероятные обогащения наблюдались по путям метаболизма глутатиона и арахидоновой кислоты. При часовой гипоксии и реоксигенации 1 час также обогащался путь метаболизма глутатиона, тогда как после трехчасовой реоксигенации обогащение наблюдается по путям метаболизма ряда аминокислот.

В результате стимуляции клеток микроглии LPS в течение часа изменения профиля метаболитов привели к обогащению путей, связанных с циклом трикарбоновых кислот, метаболизма бутаноата и ряда аминокислот. После трехчасового воздействия LPS наблюдалось переключение обогащаемых путей на метаболизм аминокислот: триптофана, фенилаланина и тирозина.

Глутатион является эндогенным антиоксидантом, участвует в метаболизме арахидоновой

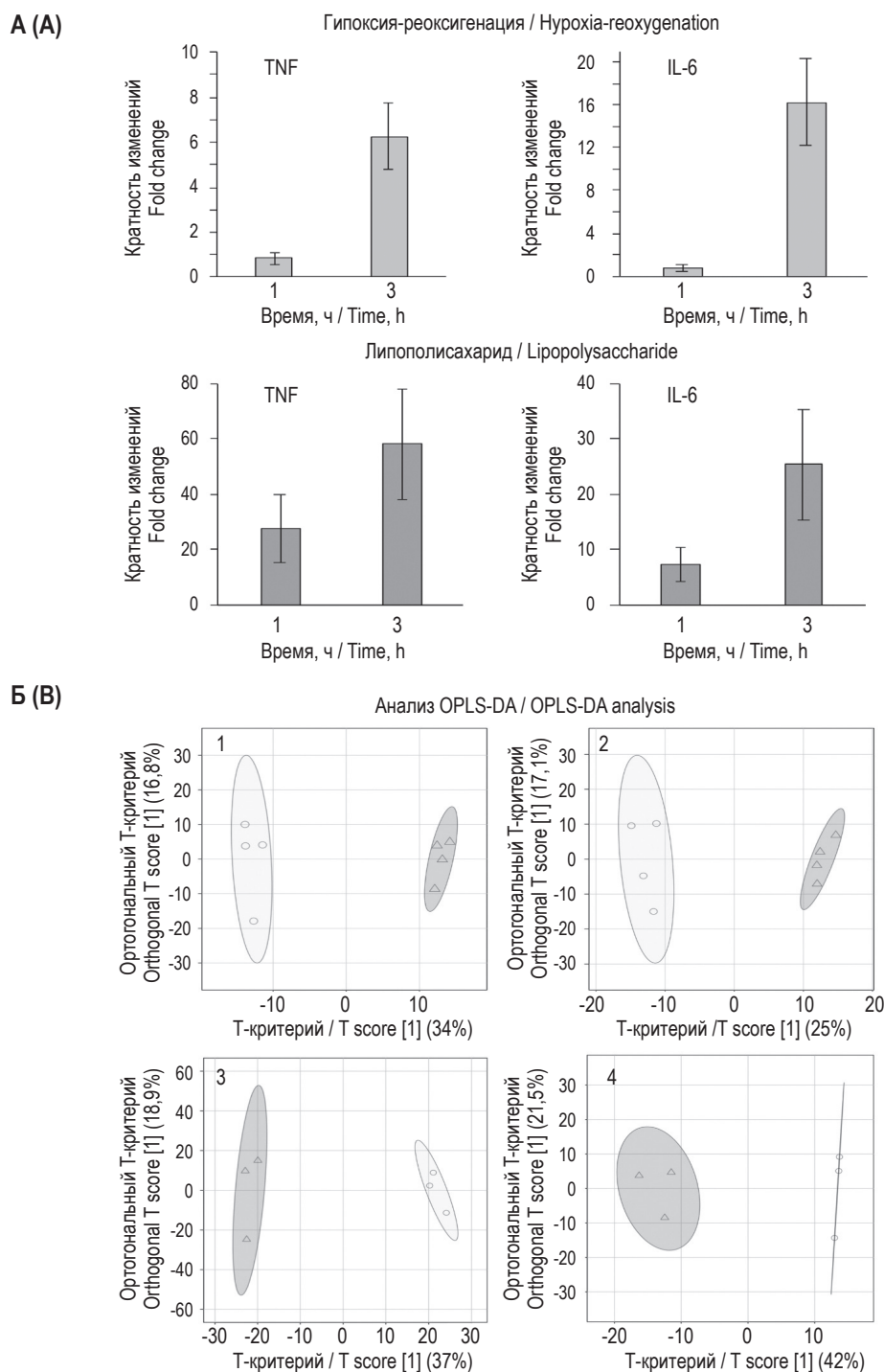


Рисунок 1. А – изменение экспрессии цитокинов TNF и IL-6 в клетках микроглии под действием гипоксии-реоксигенации и липополисахарида. Продолжительность гипоксии 1 ч, реоксигенации 1 и 3 ч соответственно. **Время инкубации с LPS (100 нг/мл) 1 и 3 часа соответственно.** **Б** – оценка отличий профилей метаболитов в группах сравнения методом дискриминантного анализа ортогональных частичных наименьших квадратов (OPLS-DA). Группы сравнения: 1 – гипоксия 1 ч, реоксигенация 1 ч, 2 – гипоксия 1 ч, реоксигенация 3 ч; 3 и 4 – инкубация с липополисахаридом 1 и 3 часа соответственно; круги (o) – образцы клеток после воздействия, треугольники (Δ) – образцы клеток без воздействий

Figure 1. A, changes in the expression of TNF and IL6 cytokines in microglial cells under the influence of hypoxia-reoxygenation and lipopolysaccharide. The duration of hypoxia is 1 hour, reoxygenation is 1 and 3 hours, respectively. Incubation time with LPS (100 ng/mL) is 1 and 3 hours, respectively. B, evaluation of differences in the profiles of metabolites in the comparison groups by discriminant analysis of orthogonal partial least squares (OPLS-DA). Comparison groups: 1, hypoxia for 1 hour, reoxygenation for 1 hour; 2, hypoxia for 1 hour, reoxygenation for 3 hours; 3 and 4, incubation with lipopolysaccharide for 1 and 3 hours, respectively; circles (o), samples of cells after exposure; triangles (Δ), samples of cells without exposure

ТАБЛИЦА 1. ОБОГАЩЕНИЕ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ ПУТЕЙ ПО ДАННЫМ ПРОФИЛИРОВАНИЯ МЕТАБОЛИТОВ В КЛЕТКАХ ЛИНИИ МИКРОГЛИИ SIM-A9

TABLE 1. ENRICHMENT OF METABOLIC PATHWAYS ACCORDING TO METABOLITE PROFILING IN SIM-A9 CELLS

Метаболические пути Metabolic pathways	Количество метаболитов в пути Pathway total	Количество выявленных метаболитов Hits total	P (критерий Фишера) P (Fisher's test)
Гипоксия 30 мин, реоксигенация 1 час Hypoxia 30 min, reoxygenation 1 h			
Метаболизм пуринов Purine metabolism	71	9	0,077
Метаболизм глутатиона Glutathione metabolism	19	5	0,077
Метаболизм пиримидинов Pyrimidine metabolism	39	3	0,233
Гипоксия 30 мин, реоксигенация 3 часа Hypoxia 30 min, reoxygenation 3 h			
Метаболизм глутатиона Glutathione metabolism	19	5	0,011
Метаболизм арахидоновой кислоты Arachidonic acid metabolism	42	13	0,045
Метаболизм глицина, серина, треонина Glycine, serine and threonine metabolism	31	6	0,098
Гипоксия 1 час, реоксигенация 1 час Hypoxia 1 h, reoxygenation 1 h			
Метаболизм глутатиона Glutathione metabolism	19	5	0,043
Метаболизм аланина, аспартата, глутамата Alanine, aspartate and glutamate metabolism	28	2	0,083
Метаболизм тирозина Tyrosine metabolism	42	2	0,083
Гипоксия 1 час, реоксигенация 3 часа Hypoxia 1 h, reoxygenation 3 h			
Метаболизм глутатиона Glutathione metabolism	19	6	0,000018
Метаболизм D-аминокислот D-Amino acid metabolism	15	8	0,000137
Метаболизм аргинина и пролина Arginine and proline metabolism	35	7	0,004
LPS 1 час LPS 1 h			
Цикл трикарбоновых кислот Citrate cycle (TCA cycle)	16	7	0,002
Метаболизм бутаноата Butanoate metabolism	15	8	0,020
Метаболизм аланина, аспартата, глутамата Alanine, aspartate and glutamate metabolism	28	13	0,024
LPS 3 час LPS 3 h			
Метаболизм триптофана Tryptophan metabolism	41	5	0,002
Метаболизм фенилаланина Phenylalanine metabolism	10	8	0,025
Метаболизм тирозина Tyrosine metabolism	42	12	0,044

кислоты, оказывает иммуномодулирующее действие, а также играет важную роль в поддержании гомеостаза нервной ткани [4]. Обогащение по пути метаболизма глутатиона, по-видимому, связано с развитием окислительного стресса в результате гипоксии-реоксигенации. Восстановленный глутатион совместно с ферментом глутатионпероксидазой являются важными компонентами антиоксидантной системы клетки, участвующей в нейтрализации активных форм кислорода, которые являются одним из факторов формирования провоспалительного фенотипа клеток микроглии [12]. Метаболизм аргинина играет важную роль в формировании реактивных форм микроглии, поскольку может быть субстратом для фермента аргиназы-1 и синтазы оксида азота, характерных для противо- и провоспалительных фенотипов микроглии соответственно [9]. Таким образом, изменение активности пути метаболизма глутатиона и аргинина может служить маркером поляризации клеток микроглии после гипоксического воздействия.

В условиях нормоксии, при короткой стимуляции (1 ч) TLR4 липополисахаридом, наблюдалось обогащение метаболических путей, свидетельствующее о значительных перестройках энергетического метаболизма. В частности, наблюдалось обогащение по путям превращений цикла трикарбоновых кислот. Ранее сообщалось, что TLR4 имеет решающее значение для активации микроглии и регуляции нейровоспаления. Его активация приводит к глюконеогенному репрограммированию и увеличению выработки лактата, ингибированию сукцинатдегидрогеназы и снижению активности цикла трикарбоновых кислот [7]. При более продолжительной стимуляции LPS наблюдалось изменение паттернов метаболических путей, с обогащением по путям метаболизма ароматических аминокислот. В частности, окислительный метаболизм триптофана может проходить по кинурининовому пути

при участии фермента индоламиндеоксигеназы (IDO), экспрессия которого усиливается под действием LPS и провоспалительных цитокинов. Усиление активности IDO приводит к продукции активных форм кислорода, что также может способствовать снижению восстановленного глутатиона. Образование кинуренина и других метаболитов может оказывать иммуномодулирующее действие, однако дальнейшие превращения могут приводить к повышению продукции NAD^+ , необходимого для поддержания окислительно-восстановительного баланса клетки в условиях нейровоспаления [3].

Выводы

Повышение экспрессии провоспалительных цитокинов под действием гипоксии и липополисахарида свидетельствует об активации клеток микроглии SIM-A9.

Изменение активности путей метаболизма глутатиона и аргинина может служить маркером поляризации клеток микроглии после гипоксического воздействия.

Активация TLR4 под действием липополисахарида приводит к модулированию путей, ассоциированных с энергетическим обменом, а также изменению путей метаболизма ароматических аминокислот.

Результаты проведенных исследований свидетельствуют о том, что провоспалительные стимулы приводят к заметным перестройкам метаболизма клеток микроглии. При этом характер данных перестроек зависит от типа стрессорного воздействия и его длительности. Можно заключить, что использованный в данной работе подход позволит в дальнейшем исследовать динамику метаболических изменений под действием провоспалительных факторов различной природы и детализировать их роль в метаболическом репрограммировании клеток микроглии на различных этапах развития нейровоспаления.

Список литературы / References

1. Chen B., Di B. Endogenous Ligands of TLR4 in microglia: potential targets for related neurological diseases. *Curr. Drug Targets*, 2024, Vol. 25, no. 14, pp. 953-970.
2. Fan H., Bai Q., Yang Y., Shi X., Du G., Yan J., Shi J., Wang D. The key roles of reactive oxygen species in microglial inflammatory activation: Regulation by endogenous antioxidant system and exogenous sulfur-containing compounds. *Eur. J. Pharmacol.*, 2023, Vol. 956, 175966. doi: 10.1016/j.ejphar.2023.175966.
3. Hestad K., Alexander J., Rootwelt H., Aaseth J.O. The role of tryptophan dysmetabolism and quinolinic acid in depressive and neurodegenerative diseases. *Biomolecules*, 2022, Vol. 12, no. 7, 998. doi: 10.3390/biom12070998.
4. Iskusnykh I.Y., Zakharova A.A., Pathak D. Glutathione in brain disorders and aging. *Molecules*, 2022, Vol. 27, no. 1, 324. doi: 10.3390/molecules27010324.
5. Li S., Park Y., Duraisingham S., Strobel F.H., Khan N., Soltow Q.A., Jones D.P., Pulendran B. Predicting network activity from high throughput metabolomics. *PLoS Comput. Biol.*, 2013, Vol. 9, no. 7, e1003123. doi: 10.1371/journal.pcbi.1003123.
6. Liu Y., Wu L., Peng W., Mao X. Glial polarization in neurological diseases: Molecular mechanisms and therapeutic opportunities. *Ageing Res. Rev.*, 2025, Vol. 104, 102638. doi: 10.1016/j.arr.2024.102638.

7. Nair S., Sobotka K.S., Joshi P., Gressens P., Fleiss B., Thornton C., Mallard C., Hagberg H. Lipopolysaccharide-induced alteration of mitochondrial morphology induces a metabolic shift in microglia modulating the inflammatory response in vitro and in vivo. *Glia*, 2019, Vol. 67, no. 6, pp. 1047-1061.
8. Ock J., Jeong J., Choi W.S., Lee W.H., Kim S.H., Kim I.K., Suk K. Regulation of Toll-like receptor 4 expression and its signaling by hypoxia in cultured microglia. *J. Neurosci. Res.*, 2007, Vol. 85, pp. 1989-1995.
9. Rana A.K., Bhatt B., Gusain C., Biswal S.N., Das D., Kumar M. Neuroimmunometabolism: how metabolism orchestrates immune response in healthy and diseased brain. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 2025, Vol. 328, no. 2, pp. E217-E229.
10. Tyrtysnaia A., Konovalova S., Bondar A., Ermolenko E., Sultanov R., Manzhulo I. Anti-inflammatory activity of N-Docosahexaenoylethanolamine and N-eicosapentaenoylethanolamine in a mouse model of lipopolysaccharide – induced neuroinflammation. *Int. J. Mol. Sci.*, 2021, Vol. 22, no. 19, 10728. doi: 10.3390/ijms221910728.
11. Wang Y., Leak R.K., Cao G. Microglia-mediated neuroinflammation and neuroplasticity after stroke. *Front. Cell. Neurosci.*, 2022, Vol. 16, 980722. doi: 10.3389/fncel.2022.980722.
12. Wang Z., Zhu H., Xiong W. Advances in mass spectrometry-based multi-scale metabolomic methodologies and their applications in biological and clinical investigations. *Sci. Bull. (Beijing)*, 2023, Vol. 68, no. 19, pp. 2268-2284.
13. Yang S., Qin C., Hu Z.W., Zhou L.Q., Yu H.H., Chen M., Bosco D.B., Wang W., Wu L.J., Tian D.S. Microglia reprogram metabolic profiles for phenotype and function changes in central nervous system. *Neurobiol. Dis.*, 2021, Vol. 152, 105290. doi: 10.1016/j.nbd.2021.105290.
14. Yao L., Kan E.M., Lu J., Hao A., Dheen S.T., Kaur C., Ling E.A. Toll-like receptor 4 mediates microglial activation and production of inflammatory mediators in neonatal rat brain following hypoxia: role of TLR4 in hypoxic microglia. *J. Neuroinflammation*, 2013, Vol. 10, 23. doi: 10.1186/1742-2094-10-23.

Авторы:

Бобров М.Ю. — к.х.н., ведущий научный сотрудник направления «Иммунология и биомедицина» Научного центра генетики и наук о жизни АНОО ВО «Научно-технологический университет “Сириус”», пгт Сириус, Краснодарский край, Россия

Никитин В.С. — лаборант-исследователь, студент магистратуры (направление «Иммунология и биомедицина») АНОО ВО «Научно-технологический университет “Сириус”», пгт Сириус, Краснодарский край, Россия

Бурак М.Ю. — лаборант-исследователь, студент магистратуры (направление «Иммунология и биомедицина») АНОО ВО «Научно-технологический университет “Сириус”», пгт Сириус, Краснодарский край, Россия

Афонин М.Б. — главный инженер-исследователь ресурсного центра аналитических методов АНОО ВО «Научно-технологический университет “Сириус”», пгт Сириус, Краснодарский край, Россия

Authors:

Bobrov M. Yu., PhD (Chemistry), Leading Researcher in the Field of “Immunobiology and biomedicine”, Scientific Center of Genetics and Life Sciences, Sirius University of Science and Technologies, Sirius settlement, Krasnodar Region, Russian Federation

Nikitin V.S., Laboratory Research Assistant, Master’s Student (Immunobiology and Biomedicine), Sirius University of Science and Technologies, Sirius settlement, Krasnodar Region, Russian Federation

Burak M. Yu., Laboratory Research Assistant, Master’s Student (Immunobiology and Biomedicine), Sirius University of Science and Technologies, Sirius settlement, Krasnodar Region, Russian Federation

Afonin M.B., Chief Research Engineer, Resource Center for Analytical Methods, Sirius University of Science and Technologies, Sirius settlement, Krasnodar Region, Russian Federation

Поступила 31.03.2025

Отправлена на доработку 11.05.2025

Принята к печати 25.05.2025

Received 31.03.2025

Revision received 11.05.2025

Accepted 25.05.2025

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ TOLL-ПОДОБНЫХ РЕЦЕПТОРОВ В СЕЛЕЗЕНКЕ И ГИПОТАЛАМУСЕ КРЫС В УСЛОВИЯХ СТРЕССИРУЮЩЕГО ВОЗДЕЙСТВИЯ И ВВЕДЕНИЯ ДЕФЕНСИНА КРЫСЫ RatNP-3

Алешина Г.М.¹, Филатенкова Т.А.¹, Шустов М.В.²

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

² ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет», Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Инфекционные заболевания и иммунные расстройства веками являлись проблемой для человечества. Для борьбы с различными заболеваниями и инфекциями крайне важно получить глубокое понимание того, как запускаются и модулируются иммунные ответы. В этом отношении Toll-подобные рецепторы (TLR) стали одной из основных тем биомедицинских исследований, поскольку это семейство белков действует как одна из ранних детерминант активации иммунного ответа. Стресс — один из наиболее частых факторов, влияющих на иммунный ответ. Он вызывает перераспределение лейкоцитов в крови, изменение уровня гормонов и выработку цитокинов. Также показано, что в условиях стрессирующего воздействия увеличивается экспрессия гена *TLR4*. Известно, что Toll-подобные рецепторы могут активироваться эндогенными молекулярными факторами, связанными с повреждением (DAMP, или алармины). Можно предположить, что среди эндогенных соединений, концентрация которых увеличивается при неблагоприятных условиях, могут быть и антагонисты TLR, задачей которых является не допустить излишнюю экспрессию этих рецепторов. Целью исследования было определить, как превентивное введение эндогенного антимикробного пептида дефенсина RatNP-3 влияет на экспрессию генов *TLR3* и *TLR4* в гипоталамусе и селезенке крыс после острого эмоционально-физического стресса, вызванного принудительным плаванием в холодной воде в течение двух минут. Через три часа после аппликации стресса крыс у животных извлекали селезенку и гипоталамус, выделяли РНК и проводили реакцию обратной транскрипции для получения кДНК. Экспрессию генов *TLR3* и *TLR4* оценивали относительно экспрессии гена «домашнего хозяйства» *GAPDH* (глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы) методом ПЦР в режиме реального времени. В результате исследования показано, что через три часа после стрессового воздействия в гипоталамусе и селезенке увеличивается экспрессия генов *TLR3* и *TLR4*. Однако предварительное внутрибрю-

Адрес для переписки:

Алешина Галина Матвеевна
ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»
197022, Россия, Санкт-Петербург, ул. Академика
Павлова, 12.
Тел.: 8 (812) 234-07-64.
E-mail: aleshina.gm@iemspb.ru

Address for correspondence:

Galina M. Aleshina
Institute of Experimental Medicine
12, Acad. Pavlov St
St. Petersburg
197022 Russian Federation
Phone: +7 (812) 234-07-64.
E-mail: aleshina.gm@iemspb.ru

Образец цитирования:

Г.М. Алешина, Т.А. Филатенкова, М.В. Шустов
«Экспрессия генов Toll-подобных рецепторов в селезенке
и гипоталамусе крыс в условиях стрессирующего
воздействия и введения дефенсина крысы RatNP-3»
// Российский иммунологический журнал, 2025. Т. 28,
№ 3. С. 561-566.
doi: 10.46235/1028-7221-17139-EOT

© Алешина Г.М. и соавт., 2025

Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

G.M. Aleshina, T.A. Filatenkova, M.V. Shustov "Expression
of Toll-like receptor genes in rat spleen and hypothalamus
under conditions of stress exposure and administration
of rat defensin RatNP-3", Russian Journal of Immunology/
Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2025, Vol. 28, no. 3,
pp. 561-566.
doi: 10.46235/1028-7221-17139-EOT

© Aleshina G.M. et al., 2025

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

DOI: 10.46235/1028-7221-17139-EOT

шинное введение дефенсина снижает уровень экспрессии этих генов только в спленоцитах, но не влияет на их экспрессию в гипоталамусе. Получены данные, указывающие на системную активацию Toll-подобных рецепторов в гипоталамических структурах мозга и селезенке в ответ на острый стресс. Тот факт, что введение эндогенных дефенсинов не влияет на экспрессию генов TLR в гипоталамусе, может свидетельствовать о том, что регуляторное действие дефенсинов нейтрофильных гранулоцитов не опосредуется через центральные механизмы регуляции.

Ключевые слова: стресс, Toll-подобные рецепторы, антимикробные пептиды, гипоталамус, селезенка, экспрессия генов

EXPRESSION OF TOLL-LIKE RECEPTOR GENES IN RAT SPLEEN AND HYPOTHALAMUS UNDER CONDITIONS OF STRESS EXPOSURE AND ADMINISTRATION OF RAT DEFENSIN RatNP-3

Aleshina G.M.^a, Filatenkova T.A.^a, Shustov M.V.^b

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

^b St. Petersburg State Chemical Pharmaceutical University, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. Infectious diseases and immune disorders present a problem for mankind for centuries. To combat various diseases and infections, it is essential to gain understanding of how immune responses are triggered and modulated. In this regard, Toll-like receptors (TLRs) have become one of the main topics of biomedical research, since this family of proteins acts as one of the early determinants of immune response activation. Stress factors are among the most common causes of changes in the immune response which lead to rearranged response of blood leukocytes, altered hormonal levels and cytokine production. It has also been shown that *TLR4* gene expression increases under stressful conditions. Endogenous damage-associated molecular factors (DAMPs, or alarmins) are known to be potential ligands of Toll-like receptors. One may assume that, TLR antagonists may be among the endogenous compounds whose concentration increases under unfavorable conditions. Their task is to prevent excessive expression of these receptors. The aim of the study was to determine how preventive administration of the endogenous antimicrobial peptide defensin RatNP-3 affects *TLR3* and *TLR4* gene expression in hypothalamus and spleen of rats after acute emotional and physical stress induced by forced swimming in cold water for two minutes. Three hours after the stress exposure to the rats, the spleen and hypothalamus were removed from the animals, RNA was isolated and a reverse transcription reaction was performed to obtain cDNA. Expression of *TLR3* and *TLR4* genes was assessed, with a reference to the housekeeping gene *GAPDH* (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) expression, being determined by real-time PCR. Three hours after stress exposure, the expression of *TLR3* and *TLR4* genes was found to increase in hypothalamus and spleen. However, the pre-exposure intraperitoneal administration of defensin reduced the expression level of these genes only in splenocytes, but did not affect their expression in hypothalamus. These results indicate to the stress-induced systemic activation of Toll-like receptors in hypothalamic structures of the brain and spleen cells. Since the administration of endogenous defensins did not affect expression of TLR genes in hypothalamus, one may suggest that the regulatory action of neutrophilic defensins is not mediated *via* central regulatory mechanisms.

Keywords: stress, Toll-like receptors, antimicrobial peptides, hypothalamus, spleen, gene expression

Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки России, государственное задание № 1022041101015-4-3.1.9 (FGWG-2025-0005).

Введение

Toll-подобные рецепторы (TLR) относятся к категории рецепторов распознавания образов

(PRR) системы защиты хозяина. PRR распознают специфические молекулярные паттерны у микробов, известные как патоген-ассоциированные молекулярные паттерны (PAMP), а также молекулы, высвобождаемые поврежденной клеткой хозяина, которые известны как молекулярные паттерны, связанные с повреждением (DAMP) [12].

Таким образом, PRR участвуют в развитии иммунного ответа против патогенов и помогают в процессе самовосстановления клетки.

Распознавание Toll-подобных рецепторов активирует сигнальный каскад, который продуцирует секретируемые цитокины и хемокины, которые затем активируют как врожденный, так и адаптивный иммунный ответ [10]. TLR присутствуют как на иммунных клетках, включая моноциты, макрофаги, дендритные клетки, нейтрофилы, В-клетки, Т-клетки, тучные клетки, естественные клетки-киллеры, так и на неиммунных клетках, включая фибробласты, эпителиальные клетки, астроциты, кератиноциты и тромбоциты [3, 4, 7]. TLR также представлены на различных опухолевых клетках, и их активация может индуцировать или уменьшать рост опухоли [6].

На сегодняшний день идентифицировано 13 членов семейства TLR, наиболее изучены из которых TLR2, TLR3 и TLR4. Рецепторы TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 и TLR10 расположены на поверхности клетки, а TLR3, TLR7, TLR8, TLR9, TLR11, и TLR13 — на мембранах внутриклеточных компартментов [9]. TLR взаимодействует с лигандом при участии корецепторных молекул (MD-2, CD14), что в дальнейшем приводит к инициации сигнального пути трансдукции, завершающейся продукцией провоспалительных молекулярных факторов (цитокинов, хемокинов и др.), интерферонов β/α или активацией регуляторных сигналов адаптивного иммунитета [5, 9].

Как уже было сказано, лигандами для Toll-подобных рецепторов могут служить эндогенные молекулы, связанные с повреждением клеток (DAMP или алармины). Можно предположить, что среди эндогенных соединений, концентрация которых увеличивается при неблагоприятных условиях, могут быть и антагонисты TLR, которые препятствуют излишней экспрессии этих рецепторов.

Одной из самых распространенных причин, вызывающих изменения иммунного ответа, являются стрессирующие воздействия, которые приводят к перераспределительным реакциям лейкоцитов крови, изменению гормонального уровня и продукции цитокинов. Еще одним хорошо известным явлением при воздействии стресса является увеличение количества нейтрофилов. Хотя это явление широко известно и является стандартным проявлением реакции организма на стресс, его биологический смысл до конца не ясен. Можно предположить, что антимикробные пептиды и белки, которые высвобождаются из нейтрофилов во внеклеточное пространство в процессе стресс-стимулированной дегрануляции, такие как пептиды дефенсины, могут не только проявлять антибиотическое действие, но

и влиять на развитие стресс-реакции по принципу обратной связи. Так, показано, что предварительное введение дефенсина крысы снижает стресс-индуцированное повышение уровня кортикостерона в крови и оказывает нормализующее действие на изменение клеточного состава крови у крыс [1].

Представляется возможным, что система TLR может играть важную роль в процессе активации врожденного иммунитета в ответ на стресс, и эндогенные антибиотические пептиды также участвуют в регуляции этого процесса.

Целью исследования было определить, как введение эндогенного антимикробного пептида дефенсина RatNP-3 влияет на экспрессию генов *TLR3* и *TLR4* в гипоталамусе и селезенке крыс после острого эмоционально-физического стресса.

Материалы и методы

Работа была выполнена на взрослых крысах-самцах массой 290–310 г породы Wistar. Крыс содержали согласно стандартам обращения с лабораторными животными.

Выделение дефенсина RNP-3 из лейкоцитов крысы проводили по схеме, применяемой для выделения антимикробных пептидов, включающей экстракцию пептидов в кислой среде, их разделение методами ультрафильтрации, препаративного электрофореза и обращено-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии. Получен высокоочищенный препарат RNP-3, чистоту и соответствие молекулярной массе подтверждали с помощью масс-спектрометрии MALDI TOF.

В качестве модели стресса использовали принудительное плавание в холодной воде. Одну группу животных помещали в бассейн, заполненный водой температурой 0–4 °С, на 2 мин, другой группе перед плаванием вводили внутривентально дефенсин RatNP-3 в дозе 100 мкг/кг веса. В качестве контрольной группы животных были взяты крысы, не подвергавшиеся никаким воздействиям. В каждой группе было по 5–6 животных. Через 3 часа после плавания животных декапитировали и извлекали гипоталамус и селезенку.

Ткани гомогенизировали с помощью гомогенизатора Precellys Evolution, из полученного гомогенизата выделяли РНК (Gene Elute Mammalian total RNA mini preparation kit, Sigma-Aldrich, США), после чего с помощью метода обратной транскрипции синтезировали комплементарную ДНК (кДНК) (RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit, Thermo Scientific, США), затем методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (амплификатор CFX 96, Bio-Rad, США) определяли относительную

степень экспрессии генов *TLR3*, *TLR4* с помощью готовой смеси реактивов «БиоМастер» Нs-qPCR (2х). Уровень экспрессии генов оценивали относительно экспрессии гена домашнего хозяйства глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (*GAPDH*).

Синтез праймеров осуществляла фирма Beagle (Санкт-Петербург):

TLR3 — прямая последовательность
5'-CGGTCAAGGTGTTCAAGA-3';

TLR3 — обратная последовательность
5'-GGATGGTAGAAGCGTGTT-3';

TLR4 — прямая последовательность
5'-CCTGAAGATCTTAAGAAGCTAT-3';

TLR4 — обратная последовательность
5'-CCTTGTCTTCAATTGTCTCAAT-3';

GAPDH — прямая последовательность
5'-CCTGCACCACCAACTGCTTAGC-3';

GAPDH — обратная последовательность
5'-GCCAGTGAGCTTCCCGTTCAGC-3'.

Специфичность продуктов амплификации контролировали по кривым плавления.

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием пакета программ Statistica 10.0 по U-критерию Манна–Уитни.

Результаты и обсуждение

Установлено, что экспрессия генов *TLR3* и *TLR4* повышается через 3 часа после стрессировющего воздействия, как в гипоталамусе, так и в селезенке, но превентивное введение дефенсина снижало уровень экспрессии этих генов только в

спленоцитах (табл. 1) и не влияло на экспрессию в гипоталамусе (табл. 2).

Как известно, стресс вызывает значительные изменения в различных системах организма, включая многочисленные перераспределительные реакции в иммунной системе как на клеточном уровне, так и на уровне гуморальных факторов. Однако степень выраженности стрессопосредованных изменений в иммунной системе и их направленность могут варьироваться в зависимости от типа стрессора и продолжительности его воздействия.

В нашем исследовании мы использовали хорошо изученную модель острого эмоционально-физического стресса, которая заключалась в том, что экспериментальные животные плавали в холодной воде в течение двух минут. Для этой модели характерны классические стрессиндуцированные реакции организма, такие как повышение уровня гормона стресса кортикостерона через 30 минут после воздействия, увеличение количества нейтрофилов и другие [1].

Ранее мы уже получили данные о том, что после воздействия такого стресса через 3 часа в гипоталамусе повышается экспрессия генов *TLR3* и *TLR4* [2]. Рецептор *TLR3* расположен на поверхности эндосом и преимущественно распознает двухцепочечную РНК. Активация *TLR3* запускает противовирусный ответ, стимулируя синтез интерферонов I типа. Однако существуют данные о том, что этот тип рецепторов также участвует в патогенезе бактериальной пневмонии и системного гипервоспаления при сепсисе [11].

Ген *TLR4* кодирует Toll-подобный рецептор 4, который является наиболее изученным членом

ТАБЛИЦА 1. ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ *TLR3* И *TLR4* ОТНОСИТЕЛЬНО ЭКСПРЕССИИ ГЕНА *GAPDH* В СЕЛЕЗЕНКЕ КРЫС ПРИ ПЛАВАТЕЛЬНОМ СТРЕССЕ И ВВЕДЕНИИ ДЕФЕНСИНА RatNP-3 (n = 5-6; Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)))

TABLE 1. *TLR3* AND *TLR4* GENE EXPRESSION RELATIVE TO *GAPDH* GENE EXPRESSION IN RAT SPLEEN UNDER SWIMMING STRESS AND ADMINISTRATION OF DEFENSIN RatNP-3 (n = 5-6; Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)))

№ No	Группы животных Groups of animals	Относительная экспрессия генов Relative gene expression	
		<i>TLR3</i>	<i>TLR4</i>
1	Интактные Intact	0,003826 (0,000868-0,008912)	0,002590 (0,002400-0,003450)
2	После стресса After stress	0,135842* (0,069348-0,151774)	0,012580* (0,005505-0,022955)
3	После стресса и введения дефенсина After stress and defensin administration	0,005384# (0,001748-0,007340)	0,002565# (0,001540-0,003150)

Примечание.* – $p < 0,05$ относительно группы 1 (по U-критерию Манна–Уитни), # – $p < 0,05$ относительно группы 2 (по U-критерию Манна–Уитни).

Note. *, $p < 0.05$ vs group 1 according to the nonparametric Mann–Whitney U test; #, $p < 0.05$ vs group 2 according to the nonparametric Mann–Whitney U test.

ТАБЛИЦА 2. ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ *TLR3* И *TLR4* ОТНОСИТЕЛЬНО ЭКСПРЕССИИ ГЕНА *GAPDH* В ГИПОТАЛАМУСЕ КРЫС ПРИ ПЛАВАТЕЛЬНОМ СТРЕССЕ И ВВЕДЕНИИ ДЕФЕНСИНА RatNP-3 (n = 5-6; Me ($Q_{0.25}$ - $Q_{0.75}$)))

TABLE 2. *TLR3* AND *TLR4* GENE EXPRESSION RELATIVE TO *GAPDH* GENE EXPRESSION IN RAT HYPOTHALAMUS UNDER SWIMMING STRESS AND ADMINISTRATION OF DEFENSIN RatNP-3 (n = 5-6; Me ($Q_{0.25}$ - $Q_{0.75}$)))

№ No	Группы животных Groups of animals	Относительная экспрессия генов Relative gene expression	
		<i>TLR3</i>	<i>TLR4</i>
1	Интактные Intact	0,001194 (0,001004-0,001818)	0,000502 (0,000259-0,000758)
2	После стресса After stress	0,003562* (0,002323-0,004334)	0,005715* (0,004373-0,018426)
3	После стресса и введения де- фенсина After stress and defensin administration	0,010525* (0,003217-0,017701)	0,011078* (0,006867-0,019288)

Примечание.* – $p < 0,05$ относительно группы 1 (по U-критерию Манна–Уитни).

Note. *, $p < 0.05$ vs group 1 according to the nonparametric Mann–Whitney U test.

семейства PRR. Он экспрессируется на поверхности большинства клеток млекопитающих и распознает широкий спектр бактериальных PAMP. Также для него описаны эндогенные лиганды. Активация этого рецептора приводит к синтезу провоспалительных цитокинов [8].

Выводы

Таким образом, получены данные, указывающие на системную активацию Toll-подобных рецепторов в гипоталамических структурах мозга

и селезенке в ответ на острый стресс. Поскольку пути сигналинга, активируемые TLR, приводят к синтезу преимущественно провоспалительных факторов, активация целого комплекса TLR также может служить сигналом для развития системного воспаления при стрессе.

Тот факт, что введение эндогенных дефенсинов не влияет на экспрессию генов TLR в гипоталамусе, свидетельствует о том, что регуляторное действие дефенсинов нейтрофильных гранулоцитов не опосредуется через центральные механизмы регуляции.

Список литературы / References

1. Янкевич И.А., Алешина Г.М., Кокряков В.Н. Особенности развития стресс-реакции у крыс при стрессирующем воздействии и введении антимикробного пептида дефенсина RatNP-3 // Медицинский академический журнал, 2014. Т. 14, № 4. С. 63-67. [Yankelevich I.A., Aleshina G.M., Kokryakov V.N. Some features of the stress reaction in rats after exposure to stress and administration of antimicrobial peptide defensin RatNP-3. *Meditsinskiy akademicheskiy zhurnal = Medical Academic Journal*, 2014, Vol. 14, no. 4, pp. 63-67. (In Russ.)]
2. Янкевич И.А., Шустов М.В., Мартышкина Ю.С., Филатенкова Т.А. Стресс-индуцированное повышение экспрессии генов TLR2, TLR3 и TLR4 в клетках гипоталамуса // Медицинский академический журнал, 2020. Т. 20, № 2. С. 11-16. [Yankelevich I.A., Shustov M.V., Martyshkina Yu.S., Filatenkova T.A. Stress-induced increased expression of TLR2, TLR3, and TLR4 genes in hypothalamic tissue. *Meditsinskiy akademicheskiy zhurnal = Medical Academic Journal*, 2020, Vol. 20, no. 2, pp. 11-16. (In Russ.)]
3. Aletaha S., Haddad L., Roozbehki, M., Bigdel, R., Asgary V., Mahmoudi M., Mirshafiey A. M2000 (b-D-mannuronic acid) as a novel antagonist for blocking the TLR2 and TLR4 downstream signalling pathway. *Scand. J. Immunol.*, 2017, Vol. 85, pp. 122-129.
4. Cognasse F., Nguyen K. A., Damien P., McNicol A., Pozzetto B., Hamzeh-Cognasse H., Garraud O. The inflammatory role of platelets via their TLRs and siglec receptors. *Front. Immunol.*, 2015, Vol. 6, 83. doi: 10.3389/fimmu.2015.00083.
5. De Nardo D. Toll-like receptors: Activation, signalling and transcriptional modulation. *Cytokine*, 2015, Vol. 74, no. 2, pp. 181-189.
6. Muccioli M., Benencia F. Toll-like receptors in ovarian cancer as targets for immunotherapies. *Front. Immunol.*, 2014, Vol. 5, 341. doi: 10.3389/FIMMU.2014.00341.
7. Ospelt C., Gay S. TLRs and chronic inflammation. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2010, Vol. 42, pp. 495-505.
8. Picard C., Casanova J.L., Puel A. Infectious diseases in patients with IRAK-4, MyD88, NEMO, or IkB α deficiency. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2011, Vol. 24, no. 3, pp. 490-497.

9. Satoh T., Akira S. Toll-like receptor signaling and its inducible proteins. *Microbiol. Spectr.*, 2016, Vol. 4, no. 6. doi: 10.1128/microbiolspec.MCHD-0040-2016.
10. Shi M., Chen X., Ye K., Yao Y., Li Y. Application potential of toll-like receptors in cancer immunotherapy: systematic review. *Medicine (Baltimore)*, 2016, Vol. 95, e3951. doi: 10.1097/MD.0000000000003951.
11. Suresh M.V., Dolgachev V.A., Zhang B., Balijepalli S., Swamy S., Mooliyil J., Kralovich G., Thomas B., Machado-Aranda D., Karmakar M., Lalwani S., Subramanian A., Anantharam A., Moore B.B., Raghavendran K. TLR3 absence confers increased survival with improved macrophage activity against pneumonia. *JCI Insight*, 2019, Vol. 4, no. 23, e131195. doi: 10.1172/jci.insight.131195.
12. Vijay K. Toll-like receptors in immunity and inflammatory diseases: past, present, and future. *Int. Immunopharmacol.*, 2018, Vol. 59, pp. 391-412.

Авторы:

Алешина Г.М. — д.б.н., доцент, заведующая лабораторией общей патологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Филатенкова Т.А. — научный сотрудник лаборатории общей патологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Шустов М.В. — лаборант научно-образовательного центра ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет», Санкт-Петербург, Россия

Authors:

Aleshina G.M., PhD, MD (Biology), Associate Professor, Head, Laboratory of General Pathology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Filatenkova T.A., Research Associate, Laboratory of General Pathology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Shustov M.V., Laboratory Assistant, Scientific and Educational Center, St. Petersburg State Chemical Pharmaceutical University, St. Petersburg, Russian Federation

Поступила 26.03.2025
Принята к печати 25.05.2025

Received 26.03.2025
Accepted 25.05.2025

КОНЬЮГАТЫ БЕЛКА А С АНТИГЕНОМ СПОСОБНЫ УСИЛИВАТЬ ВЫРАБОТКУ СПЕЦИФИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ ПРИ ИНТРАНАЗАЛЬНОМ ВВЕДЕНИИ

Волосникова Е.А., Волкова Н.В., Гайворонский С.И., Симакова О.В.,
Есина Т.И., Рар А.А., Щербаков Д.Н.

ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии “Вектор”» Роспотребнадзора,
р. п. Кольцово, Новосибирская обл., Россия

Резюме. Цель — изучение иммуногенных свойств конъюгатов белка А с рецептор-связывающим доменом (RBD) спайкового белка SARS-CoV-2 (вариант B.1.617.2, Delta) и их способности индуцировать специфический гуморальный иммунный ответ при интраназальном введении. Конъюгаты рекомбинантного RBD (SARS-CoV-2, вариант Delta) с белком А *Staphylococcus aureus* получали с использованием EDC или Sulfo-SMCC (1:1 моль) с последующей очисткой гель-фильтрацией. Иммунизацию проводили на 80 мышах Balb/c (6 недель), разделенных на группы по 10 особей. Животным опытных групп двукратно с интервалом 14 дней вводили интраназально 20 мкл конъюгата (50 мкг RBD), контрольным группам — RBD внутримышечно или физраствор. Кровь забирали на 10-й день после бустинга. Титр специфических IgG определяли ИФА с использованием RBD в качестве антигена. Статистическую значимость оценивали с помощью U-критерия Манна–Уитни (GraphPad Prism 8.0, $p < 0,05$). Интраназальное введение конъюгатов RBD с белком А (Con-S и Con-E) индуцировало высокие титры специфических IgG (до 10^5), сопоставимые с внутримышечным введением RBD. Оба конъюгата показали статистически значимое усиление иммунного ответа по сравнению с интраназальным введением свободного RBD ($p \leq 0,05$). При этом наблюдалась гетерогенность ответа среди животных: часть мышей демонстрировала слабый иммунный ответ, что может быть связано с особенностями интраназального введения. Конъюгаты RBD с белком А *Staphylococcus aureus* при интраназальном введении вызывают выраженный IgG-ответ, сравнимый с внутримышечной иммунизацией, демонстрируя адъювантные свойства белка А. Оба метода конъюгирования (Sulfo-SMCC и EDC) одинаково эффективны. Несмотря на вариабельность ответа, связанную с особенностями мукозального введения, результаты подтверждают перспективность использования белка А в разработке интраназальных вакцин против SARS-CoV-2.

Ключевые слова: мукозальные вакцины, белок А *Staphylococcus aureus*, SARS-CoV-2, интраназальная иммунизация, адъюванты, гуморальный иммунный ответ

Адрес для переписки:

Волосникова Екатерина Александровна
ФБУН «Государственный научный центр вирусологии
и биотехнологии “Вектор”» Роспотребнадзора
630559, Россия, Новосибирская обл., р. п. Кольцово.
Тел.: 8 (383) 363-80-14.
Факс: 8 (383) 363-80-16.
E-mail: volosnikova_ea@vector.nsc.ru, kulenok84@mail.ru

Address for correspondence:

Ekaterina A. Volosnikova
State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector”
Koltsovo, Novosibirsk Region
630559 Russian Federation
Phone: +7 (383) 363-80-14.
Fax: +7 (383) 363-80-16.
E-mail: volosnikova_ea@vector.nsc.ru, kulenok84@mail.ru

Образец цитирования:

Е.А. Волосникова, Н.В. Волкова, С.И. Гайворонский,
О.В. Симакова, Т.И. Есина, А.А. Рар, Д.Н. Щербаков
«Конъюгаты белка А с антигеном способны
усиливать выработку специфических антител
при интраназальном введении» // Российский
иммунологический журнал, 2025. Т. 28, № 3. С. 567-572.
doi: 10.46235/1028-7221-17148-PAA

© Волосникова Е.А. и соавт., 2025
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

E.A. Volosnikova, N.V. Volkova, S.I. Gayvoronskiy,
O.V. Simakova, T.I. Esina, A.A. Rar, D.N. Shcherbakov
“Protein A-antigen conjugates enhance production of specific
antibodies following intranasal administration”, Russian
Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii
Zhurnal, 2025, Vol. 28, no. 3, pp. 567-572.
doi: 10.46235/1028-7221-17148-PAA

© Volosnikova E.A. et al., 2025
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.46235/1028-7221-17148-PAA

PROTEIN A-ANTIGEN CONJUGATES ENHANCE PRODUCTION OF SPECIFIC ANTIBODIES FOLLOWING INTRANASAL ADMINISTRATION

Volosnikova E.A., Volkova N.V., Gayvoronskiy S.I., Simakova O.V., Esina T.I., Rar A.A., Shcherbakov D.N.

State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation

Abstract. The objective of our work was to study immunogenic properties of protein A conjugates with the receptor-binding domain (RBD) of the SARS-CoV-2 spike protein (B.1.617.2, Delta variant) and their ability to induce a specific humoral immune response following intranasal administration. Recombinant RBD (SARS-CoV-2, Delta variant) conjugates with *Staphylococcus aureus* protein A were prepared using EDC or Sulfo-SMCC (1:1 molar ratio) followed by gel filtration purification. Immunization procedure was performed in 80 six-week-old Balb/c mice, divided into groups of 10 animals. Experimental groups received intranasal administration of 20 μ L conjugate (50 μ g RBD) twice at a 14-day interval, while control groups received intramuscular RBD or saline. Blood was collected 10 days after boosting. Specific IgG titers were determined by ELISA using RBD as the antigen. Statistical significance was assessed using the Mann–Whitney U test (GraphPad Prism 8.0, $p < 0.05$). Intranasal administration of RBD-protein A conjugates (Con-S and Con-E) induced high specific IgG titers (up to 10^5), comparable to intramuscular RBD immunization. Both conjugates showed statistically significant enhancement of the immune response compared to intranasal administration of free RBD ($p \leq 0.05$). However, the response proved to be heterogenous among animals, with some mice exhibiting a weak immune response, likely due to intranasal delivery variability. RBD-protein A conjugates elicit a robust IgG response upon intranasal administration, comparable to intramuscular immunization, confirming the adjuvant properties of protein A. Both conjugation methods (Sulfo-SMCC and EDC) were equally effective. Despite response variability due to different mucosal delivery, these findings support the potential of protein A in developing intranasal vaccines against SARS-CoV-2.

Keywords: mucosal vaccines, *Staphylococcus aureus* protein A, SARS-CoV-2, intranasal immunization, adjuvants, humoral immunity

Работа выполнена в рамках государственного задания, тема ГЗ-1/22 «Поиск и фармако-токсикологическое исследование новых вакцинных адъювантов».

Введение

Современная вакцинология активно развивается в направлении поиска новых способов доставки антигенов и усиления иммунного ответа, особенно на слизистых оболочках, которые являются первым барьером на пути многих патогенов [7]. Интраназальное и пероральное введение вакцин представляет особый интерес, поскольку оно позволяет стимулировать как местный мукозальный, так и системный иммунный ответ, что критически важно для защиты от респираторных и других инфекций, передающихся через слизистые оболочки [5].

Одним из ключевых факторов успеха мукозальных вакцин является использование эффективных адъювантов — веществ, которые усиливают иммунный ответ на вводимый антиген [7].

Можно выделить несколько групп подобных адъювантов. Бактериальные токсины и их производные, агонисты паттерн-распознающих рецепторов, наночастицы и липидные системы доставки, цитокины и мукоадгезивные системы [3, 4, 7]. Особый интерес представляют белковые мукозальные адъюванты, наиболее изученным из которых является холерный токсин [5, 12]. Субъединица В холерного токсина взаимодействует с рецептором GM1, который экспрессируется на макрофагах, дендритных и В-клетках, вызывая индукцию иммунного ответа. Показано, что рекомбинантный аналог В субъединицы холерного токсина стимулирует Т-хелперные клетки Th1 и Th2-типа.

Холерный токсин, являясь одним из самых мощных мукозальных адъювантов [1], может также выступать в роли системы доставки антигена и способен формировать эффективный иммунный ответ в месте внедрения большинства известных патогенов. Описаны конструкции, содержащие последовательность В-субъединицы холерного токсина в единой рамке считывания с

Fc-фрагментом IgG [6]. Описан и ряд других адъювантов на основе бактериальных токсинов [7].

В данном исследовании мы сосредоточились на изучении способности конъюгатов рекомбинантного токсина *Staphylococcus aureus* с белком антигеном стимулировать выработку специфических антител при интраназальном введении. Актуальность этой работы обусловлена необходимостью разработки новых адъювантов, которые могли бы обеспечить длительный и устойчивый иммунный ответ на слизистых оболочках, что особенно важно для профилактики инфекционных заболеваний, таких как грипп, COVID-19 и других респираторных инфекций [11].

Целью настоящего исследования стало изучение иммуногенных свойств конъюгатов белка А с рецептор-связывающим доменом (RBD) спайкового белка SARS-CoV-2 (вариант B.1.617.2, Delta) и их способности индуцировать специфический гуморальный иммунный ответ при интраназальном введении.

Материалы и методы

Метод получения конъюгатов

Получение конъюгатов рекомбинантного белка А и рекомбинантного RBD (вариант B.1.617.2 (Delta)) проводили с использованием 1-этил-3-[3-диметиламинопропил]карбодиимид гидрохлорида (EDC) и сульфосукцинмидил-4-[N-малеимидометил]-циклогексан-1-карбоксилата (Sulfo-SCMM). При проведении реакции конъюгирования к субстанции белка RBD добавляли сшивающий агент EDC либо Sulfo-SCMM в соотношении 1:1 моль, инкубировали смесь в течение 2 часов при 2–8 °С и добавляли субстанцию белка А, инкубировали смесь в течение 2 часов при 2–8 °С. В случае конъюгирования с помощью Sulfo-SCMM амидные группы восстанавливали добавлением боргидрида натрия в соотношении 1:10 белок RBD:боргидрид натрия. Непрореагировавшие компоненты удаляли с помощью гель-фильтрации на сефакириле S-200.

Определение концентрации белка в конъюгатах

Определение проводили методом Лоури без предварительного осаждения белка по ГФ XIV, том 1, ОФС.1.2.3.0012.15 «Определение белка» (метод 2, колориметрический).

Иммунизация животных

Исследование проведено на 80 самках мышей линии Balb/c возрастом 6 недель, с массой тела 18–22 г, полученных из питомника ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (р. п. Кольцово Новосибирской обл.). Животные были распределены случайным образом на группы по 10 особей в каждой.

Для индукции иммунного ответа мышам опытных групп вводили интраназально двукратно с интервалом 14 суток 1 дозу (20 мкл) конъюгата белка RBD с белком А, в которой содержится отработанная ранее доза белка RBD (50 мкг) в суммарном объеме 20 мкл/мышь. Мыши группы сравнения получали инъекции RBD внутримышечно в тех же дозах в объеме 200 мкл/мышь по аналогичной схеме. Мышам контрольной группы вводили физиологический раствор интраназально в объеме 20 мкл.

Забор крови у мышей проводили на 10-й день после второй иммунизации пастеровской пипеткой из ретроорбитального синуса в объеме 0,5 мл. Процедура выполнялась на анестезированных с помощью углекислого газа животных [2].

Для формирования сгустка и отделения сыворотки кровь оставляли при комнатной температуре на 15 минут, затем края сгустка крови аккуратно, не разрушая клетки, обводили чистой иглой для открепления от стенок пробирки и центрифугировали в течение 15 мин при 3 тыс. об/мин и температуре 4–6 °С 1 час, затем выдерживали в холодильнике при (4±2) °С в течение двух часов. Центрифугирование проводили на центрифуге 5810R при температуре (6±2) °С со скоростью 1800 об/мин в течение 15 минут. Полученную сыворотку аккуратно, не захватывая форменные элементы, отбирали пипеткой и переливали в промаркированные микроцентрифужные пробирки. Сыворотки крови хранили при температуре (6±2) °С не более 7 дней. Для более длительного хранения сыворотки замораживали при температуре минус 20 °С. После забора крови мышей подвергали эвтаназии путем цервикальной дислокации.

Анализ титров специфических антител

Титры специфичных антител в сыворотках крови определяли методом иммуноферментного анализа. В качестве антигена использовали рекомбинантный рецептор-связывающий домен (RBD) спайкового белка SARS-CoV-2 (вариант B.1.617.2 (Delta)). Сорбцию антигенов (200 нг/лунку) проводили в буфере 0,1 М NaHCO₃. Для выявления антител использовали конъюгат антимышиных антител с пероксидазой хрена в рабочем разведении 1:2000 (Sigma-Aldrich, США). Для регистрации уровня оптической плотности после добавления субстрата и остановки реакции использовали мультимодальный ридер Thermo Scientific Varioskan LUX при длине волны 450 нм. Титр определяли по значению максимального разведения, при котором сигнал оптической плотности превышал значение оптической плотности лунок с отрицательным контролем более чем в три раза.

Статистический анализ

Статистический анализ проводился с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 8.0, при этом $p < 0,05$ считали показателем статистической значимости. Статистическую значимость различий среди разных групп животных определяли с помощью двустороннего непараметрического U-критерия Манна–Уитни с 95% доверительным интервалом или критерия Краскела–Уоллиса (для более чем двух групп).

Результаты и обсуждение

Мукозальные вакцины являются привлекательным способом формирования специфического иммунитета, потому что способны обеспечить защиту на уровне входных ворот инфекции. Особенно это актуально для инфекций, переда-

ющихся воздушно-капельным путем, поэтому проверку возможности использования рекомбинантного белка A *Staphylococcus aureus* в качестве мукозального адъюванта было решено провести на модели SARS-CoV-2. В качестве антигена был выбран RBD спайкового белка, т. к. он является основной мишенью вирус-нейтрализующих антител, и формирование иммунитета против него способно обеспечить защиту организма от заражения [9, 13].

Рекомбинантные белки RBD (вариант B.1.617.2 (Delta)) и Z домен белка A *Staphylococcus aureus*, использованные в работе для синтеза конъюгатов, были получены в ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. С использованием двух сшивающих агентов Sulfo-SMCC и EDC было получено два препарата Con-S и Con-E соответственно. Конъюгат был рассчитан таким образом, чтобы на одну молекулу RBD приходилась одна молекула рекомбинантного белка A. При помощи гель-фильтрации были отобраны стабильные комплексы, которые выходили отдельным пиком и составляли до 90% от всех пиков. Это свидетельствует о том, что выбранный метод конъюгации эффективен и позволяет получать высокий выход конъюгата в реакции синтеза.

Изучение адъювантных свойств проводили на модели мышей Balb/c. Животным опытных групп интраназально вводили препараты в дозе 50 мкг (RBD), двукратно с интервалом 14 суток. Мыши группы сравнения получали инъекции RBD внутримышечно в тех же дозах с аналогичным интервалом. Мышам контрольной группы вводили физиологический раствор интраназально.

Интраназальная иммунизация мышей конъюгатами рекомбинантного белка A и RBD привела к индукции высоких титров специфических IgG. Значение среднего реципрокного титра антител групп Con-S и Con-E достоверно не отличалось и достигло 10^5 (рис. 1). Сходные значения были получены для сывороток мышей, иммунизированных RBD внутримышечно. В то же время они достоверно отличались от значений группы мышей, иммунизированных RBD интраназально, без использования адъюванта по сравнению с группой, получавшей свободный RBD (рис. 1). Полученные данные позволяют предположить, что белок A, связываясь с Fc-фрагментами иммуноглобулинов, может усиливать презентацию антигена иммунным клеткам, что способствует более эффективной активации гуморального иммунного ответа. Это согласуется с современными представлениями о роли Fc-зависимых механизмов в модуляции иммунного ответа, особенно в контексте использования адъювантов для усиления иммуногенности антигенов [10].

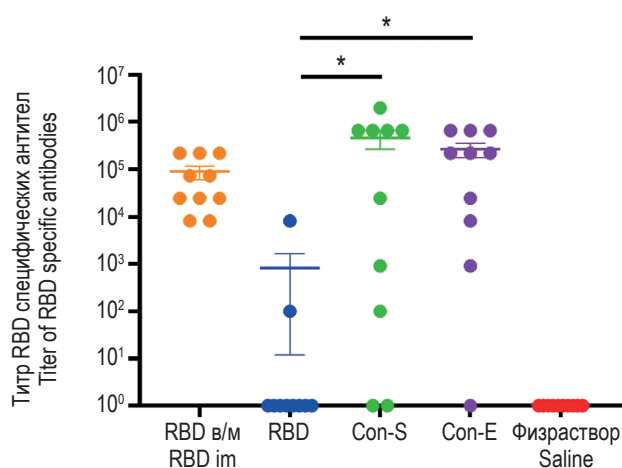


Рисунок 1. Реципрокные титры специфических антител у мышей Balb/c иммунизированных конъюгатами RBD

Примечание. RBD в/м – внутримышечное введение антигена; RBD – интраназальное введение антигена; Con-S – интраназальное введение конъюгата, полученного при помощи Sulfo-SMCC; Con-E – интраназальное введение конъюгата, полученного при помощи EDC; физр-р – интраназальное введение физиологического раствора. Для оценки значимости межгрупповых различий применяли непараметрический U-критерий Манна–Уитни с критическим уровнем статистической значимости (p), равным 0,05. * – статистически значимые отличия по отношению к группе (без адъюванта), $p \leq 0,05$.

Figure 1. Reciprocal titers of specific antibodies in Balb/c mice immunized with experimental RBD-based conjugates

Note. RBD im, intramuscular administration of the antigen; RBD, intranasal administration of the antigen; Con-S, intranasal administration of the conjugate obtained using Sulfo-SMCC; Con-E, intranasal administration of the conjugate obtained using EDC; saline, intranasal administration of physiological solution. To assess the significance of intergroup differences, the nonparametric Mann–Whitney U test was used with a critical level of statistical significance (p) equal to 0.05. *, statistically significant differences in relation to the group (without adjuvant), $p \leq 0.05$.

Необходимо обратить внимание, что иммунный ответ для групп Con-S и Con-E был в значительной степени гетерогенным, часть животных отвечала слабо или не ответила совсем, в то время как в группе внутримышечного введения у всех животных наблюдали индукцию специфических антител, а реципрокный титр антител в сыворотках лежал в диапазоне 10^4 - 10^5 . Этот результат, по всей видимости, связан с тем, что интраназальное введение и использование мышей как модели сопряжено со сложностью контроля полноты введения препарата. В то же время полученный результат указывает на достоверную способность конъюгатов белка А стимулировать выработку специфического иммунитета.

Наше исследование показало принципиальную возможность использования белка А *Staphylococcus aureus* для получения вакцинных конструкций. На следующем этапе планируется изучение местного иммунитета, в первую очередь уровня IgA на слизистых оболочках и клеточного иммунного ответа.

Выводы

Интраназальное введение конъюгатов рекомбинантного белка А *Staphylococcus aureus* с RBD-доменом спайкового белка SARS-CoV-2 (вариант Delta) индуцировало высокие титры специфических IgG в сыворотке крови мышей, сопоставимые с внутримышечным введением свободного RBD. Оба метода конъюгирования (с использованием Sulfo-SMCC и EDC) показали схожую эффективность, что подтверждает стабильность и функциональность полученных комплексов. Конъюгаты достоверно усиливали гуморальный иммунный ответ по сравнению с интраназальным введением RBD без адъюванта, что свидетельствует о способности белка А выступать в роли мукозального адъюванта. Наблюдалась значительная вариабельность уровня антител среди животных в группах интраназального введения, что может быть связано с техническими сложностями контроля дозировки при мукозальной иммунизации или индивидуальными особенностями проникновения антигена через слизистый барьер.

Список литературы / References

1. Андреев Ю.Ю., Топтыгина А.П. Адъюванты и иммуномодуляторы в составе вакцин // Иммунология, 2021. Т. 42, № 6. С. 720-729. [Andreev Y.Y., Toptygina A.P. Adjuvants and immunomodulators in vaccines. *Immunologiya = Immunology*, 2021, Vol. 42, no. 6, pp. 720-729. (In Russ.)]
2. Дьякон А.В., Хрыкина И.С., Хегай А.А., Дьяченко И.А., Мурашев А.Н., Ивашев М.Н. Метод забора крови у животных // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований, 2013. Т. 11, № 1. С. 84-85. [Dyakon A.V., Khrykina I.S., Khegay A.A., Dyachenko I.A., Murashev A.N., Ivashev M.N. Method of blood sampling in animals. *Mezhdunarodnyi zhurnal prikladnykh i fundamentalnykh issledovaniy = International Journal of Applied and Fundamental Research*, 2013, Vol. 11, no. 2, pp. 84-85. (In Russ.)]
3. Borges O., Borchard G. Mucosal vaccination: opportunities and challenges. In: Singh M. (ed.). Novel immune potentiators and delivery technologies for next generation vaccines. Springer US, 2013, pp. 65-80.
4. Eriksson K., Holmgren J. Recent advances in mucosal vaccines and adjuvants. *Curr. Opin. Immunol.*, 2002, Vol. 14, no. 5, pp. 666-672.
5. Holmgren J., Czerkinsky C. Mucosal immunity and vaccines. *Nat. Med.*, 2005, Vol. 11, no. 4 Suppl., pp. S45-S53. doi: 10.1038/nm1213.
6. Kim M.Y., Vergara E., Tran A., Paul M.J., Kwon T.H., Ma J.K.C., Jang Y.S., Reljic R. Marked enhancement of the immunogenicity of plant-expressed IgG-Fc fusion proteins by inclusion of cholera toxin non-toxic B subunit within the single polypeptide. *Plant Biotechnol. J.*, 2024, Vol. 22, no. 5, pp. 1402-1416. doi: 10.1111/pbi.14275.
7. Li M., Wang Y., Sun Y., Cui H., Zhu S.J., Qiu H.J. Mucosal vaccines: Strategies and challenges. *Immunol. Lett.*, 2020, Vol. 217, pp. 116-125.
8. Lycke N. Recent progress in mucosal vaccine development: Potential and limitations. *Nat. Rev. Immunol.*, 2012, Vol. 12, pp. 592-605.
9. Puga-Gómez R., Ricardo-Delgado Y., Rojas-Iriarte C., Céspedes-Henriquez L., Piedra-Bello M., Vega-Mendoza D., Pérez N.P., Paredes-Moreno B., Rodríguez-González M., Valenzuela-Silva C., Sánchez-Ramírez B., Rodríguez-Noda L., Pérez-Nicado R., González-Mugica R., Hernández-García T., Fundora-Barrios T., Echevarría M.D., Enriquez-Puertas J.M., Infante-Hernández Y., Palenzuela-Díaz A., Gato-Orozco E., Chappi-Estévez Y., Francisco-Pérez J.C., Suarez-Martinez M., Castillo-Quintana I.C., Fernandez-Castillo S., Climent-Ruiz Y., Santana-Mederos D., García-Vega Y., Toledo-Romani M.E., Doroud D., Biglari A., Valdés-Balbín Y., García-Rivera D., Vérez-Bencomo V.; SOBERANA Research Group. Open-label phase I/II clinical trial of SARS-CoV-2 receptor binding domain-tetanus toxoid conjugate vaccine (FINLAY-FR-2) in combination with receptor binding domain-protein vaccine (FINLAY-FR-1A) in children. *Int. J. Infect. Dis.*, 2023, Vol. 126, pp. 164-173.
10. Silverman G.J., Goodyear C.S., Siegel D.L. On the mechanism of staphylococcal protein A immunomodulation. *Transfusion*, 2005, Vol. 45, no. 2, pp. 274-280.

11. Xing M., Hu G., Wang X., Wang Y., He F., Dai W., Wang X., Niu Y., Liu J., Liu H., Zhang X., Xu J., Cai Q., Zhou D. An intranasal combination vaccine induces systemic and mucosal immunity against COVID-19 and influenza. *NPJ Vaccines*, 2024, Vol. 9, no. 1, 64. doi: 10.1038/s41541-024-00857-5.
12. Yuki Y., Kiyono H. Mucosal vaccines: novel advances in technology and delivery. *Expert Rev. Vaccines*, 2009, Vol. 8, no. 8, pp. 1083-1097.
13. Zhao T., Liu S., Wang P., Zhang Y., Kang X., Pan X., Li L., Li D., Gao P., An Y., Song H., Liu K., Qi J., Zhao X., Dai L., Liu P., Wang P., Wu G., Zhu T., Xu K., Li Y., Gao G.F. Protective RBD-dimer vaccines against SARS-CoV-2 and its variants produced in glycoengineered *Pichia pastoris*. *PLoS Pathog.*, 2024, Vol. 20, no. 8, e1012487. doi: 10.1371/journal.ppat.1012487.

Авторы:

Волосникова Е.А. — к.б.н., ведущий научный сотрудник, заведующая отделом разработки технологий и пилотного производства биопрепаратов ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии “Вектор”» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово, Новосибирская обл., Россия

Волкова Н.В. — к.б.н., научный сотрудник лаборатории молекулярной и синтетической биологии ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии “Вектор”» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово, Новосибирская обл., Россия

Гайворонский С.И. — стажер-исследователь лаборатории молекулярной и синтетической биологии ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии “Вектор”» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово, Новосибирская обл., Россия

Симакова О.В. — младший научный сотрудник отдела биологических исследований ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии “Вектор”» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово, Новосибирская обл., Россия

Есина Т.И. — научный сотрудник отдела разработки технологий и пилотного производства биопрепаратов ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии “Вектор”» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово, Новосибирская обл., Россия

Рар А.А. — инженер-микробиолог отдела разработки технологий и пилотного производства биопрепаратов ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии “Вектор”» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово, Новосибирская обл., Россия

Шербаков Д.Н. — ведущий научный сотрудник, заведующий лабораторией молекулярной и синтетической биологии ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии “Вектор”» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово, Новосибирская обл., Россия

Authors:

Volosnikova E.A., PhD (Biology), Senior Researcher, Department of Technology Development and Pilot Production of Biopreparations, State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector”, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation

Volkova N.V., PhD (Biology), Researcher, Laboratory of Molecular and Synthetic Biology, State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector”, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation

Gayvoronskiy S.I., Intern Researcher, Laboratory of Molecular and Synthetic Biology, State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector”, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation

Simakova O.V., Junior Researcher, Department of Biological Studies, State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector”, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation

Esina T.I., Researcher, Department of Technology Development and Pilot Production of Biopreparations, State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector”, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation

Rar A.A., Engineer Microbiologist, Department of Technology Development and Pilot Production of Biopreparations, State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector”, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation

Shcherbakov D.N., Leading Researcher, Head, Laboratory of Molecular and Synthetic Biology, State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector”, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation

Поступила 28.03.2025
Отправлена на доработку 03.04.2025
Принята к печати 25.05.2025

Received 28.03.2025
Revision received 03.04.2025
Accepted 25.05.2025

ОЦЕНКА ВОЗМОЖНОСТИ ОДНОВРЕМЕННОГО ИССЛЕДОВАНИЯ ГЛИКОЛИЗА И ОКИСЛИТЕЛЬНОГО ФОСФОРИЛИРОВАНИЯ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ТЕСТ-НАБОРОВ SEAHORSE XF

Пономарева В.Н., Власова В.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*

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

Резюме. Метаболизм играет ключевую роль в поддержании пролиферации и функций иммунных клеток. Множество ферментативных реакций, главными из которых являются гликолиз и окислительное фосфорилирование, позволяет клеткам производить энергию, а также необходимые компоненты для синтеза белков, липидов и нуклеотидов. Современным подходом в изучении процессов, связанных с метаболизмом клетки, является использование анализатора Seahorse XF, который в реальном времени измеряет уровень внеклеточного закисления и потребления кислорода. Это позволяет получить точную информацию о динамике гликолиза и окислительного фосфорилирования в исследуемых клетках. Для оценки этих параметров применяются тест-наборы Glycolytic Rate Assay Kit и Cell Mito Stress Test Kit, часть компонентов которых идентична. Тем не менее возможность одновременного использования компонентов этих тестов для исследования нескольких метаболических путей не предусмотрена, что приводит к увеличению трудоемкости и стоимости комплексных исследований, а также к повышенным требованиям к количеству биоматериала и риску ошибок при обработке данных. Цель работы — оценка возможности одновременного исследования гликолиза и окислительного фосфорилирования с использованием тест-наборов Seahorse XF. Были использованы три варианта тестов: 1) Glycolytic Rate Assay; 2) Cell Mito Stress Test; 3) комбинированный тест, подразумевающий последовательное внесение растворов ингибиторов из оригинальных тестов. Показано, что объединение тестов не влияет на фиксируемые на базальном уровне показатели гликолиза и окислительного фосфорилирования. Другие параметры, такие как максимальная скорость гликолиза и окислительного фосфорилирования, компенсаторный гликолиз и резервная дыхательная емкость митохондрий, в совместном исследовании также были сопоставимы со значениями отдельных тестов. Таким образом, совместное применение компонентов тест-наборов Glycolytic Rate Assay Kit и Cell Mito Stress Test Kit дает возможность одновременно изучать широкий диапазон метаболических показателей иммунных клеток, от базальных значений гликолитической и дыхательной активности

Адрес для переписки:

Пономарева Валерия Николаевна
Институт экологии и генетики микроорганизмов
Уральского отделения Российской академии наук
614081, Россия, г. Пермь, ул. Голева, 13.
Тел.: 8 (324) 280-75-60.
E-mail: ponomarievaVN@yandex.ru

Address for correspondence:

Valeria N. Ponomareva
Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms
13 Golev St
Perm
614081 Russian Federation
Phone: +7 (324) 280-75-60.
E-mail: ponomarievaVN@yandex.ru

Образец цитирования:

В.Н. Пономарева, В.В. Власова «Оценка возможности
одновременного исследования гликолиза и
окислительного фосфорилирования с использованием
тест-наборов Seahorse XF» // Российский
иммунологический журнал, 2025. Т. 28, № 3. С. 573-578.
doi: 10.46235/1028-7221-17152-AFO

© Пономарева В.Н., Власова В.В., 2025
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

V.N. Ponomareva, V.V. Vlasova "Assessing feasibility
of simultaneous evaluation of glycolysis and oxidative
phosphorylation using Seahorse XF test kits", Russian Journal
of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2025,
Vol. 28, no. 3, pp. 573-578.
doi: 10.46235/1028-7221-17152-AFO

© Ponomareva V.N., Vlasova V.V., 2025
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.46235/1028-7221-17152-AFO

до максимальных показателей и резервной емкости гликолиза и окислительного фосфорилирования. Это не приводит к потере качества получаемого результата, однако уменьшает количество необходимого биологического материала и погрешность при его обработке. Использование комбинированного подхода создаст возможность для глубокого изучения метаболических аспектов, связанных с активацией и пролиферацией как иммунных, так и опухолевых клеток.

Ключевые слова: иммунные клетки, метаболизм, гликолиз, окислительное фосфорилирование, митохондрии, анализатор Seahorse XF

ASSESSING FEASIBILITY OF SIMULTANEOUS EVALUATION OF GLYCOLYSIS AND OXIDATIVE PHOSPHORYLATION USING SEAHORSE XF TEST KITS

Ponomareva V.N., Vlasova V.V.

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

Abstract. Metabolism is essential for proliferation and function of immune cells. Many enzymatic processes, primarily glycolysis and oxidative phosphorylation (OXPHOS), enable energy production and generate intermediates critical for synthesizing proteins, lipids, and nucleotides. Modern metabolic studies increasingly employ the Seahorse XF analyzer which measures extracellular acidification and oxygen consumption in real time, providing dynamic insights into glycolytic and OXPHOS rates. To assess these parameters, researchers typically use the Glycolytic Rate Assay Kit and Cell Mito Stress Test Kit. While these kits share some components, their simultaneous use for multi-pathway analysis is not standardized, resulting in increased labor, costs and sample requirements, as well as higher risks of data processing errors. The aim of this study was to evaluate the feasibility of combining these kits in order to measure glycolysis and OXPHOS in simultaneous mode using the Seahorse XF assay kits. Three experimental approaches were tested: 1) Glycolytic Rate Assay; 2) Cell Mito Stress Test; 3) combined protocol involving sequential addition of inhibitor solutions from both kits. Our experiments have shown that combining the tests does not affect the baseline measurements of glycolysis and OXPHOS. Other parameters, such as the maximum glycolytic and respiration rates, compensatory glycolysis, and reserved respiratory capacity, were also comparable to individual assay results in combined analyses. When combining the reagent components from Glycolytic Rate Assay Kit and Cell Mito Stress Test Kit, one may perform simultaneous analysis of a wide range of metabolic parameters in immune cells, ranging from baseline glycolysis and OXPHOS values to its peak values, as well as reserve glycolysis and OXPHOS capacities. This approach provides data quality while reducing the required sample material and minimizing processing errors. The use of a combined protocol creates an opportunity for in-depth studies of metabolic aspects of immune cell activation and proliferation as well as tumor cell biology.

Keywords: immune cells, metabolism, glycolysis, oxidative phosphorylation, mitochondria, Seahorse XF analyzer

Работа выполнена в рамках государственного задания № 124021900006-5. В работе использовано оборудование ЦКП «Исследования материалов и вещества» ПФИЦ УрО РАН.

Введение

Метаболизм поддерживает функциональную активность и пролиферацию всех клеток организма, в том числе клеток иммунной системы [8]. Он представляет собой комплекс ферментативных реакций, объединенных в различные обменные

процессы, такие как гликолиз, цикл трикарбоновых кислот, окислительное фосфорилирование, пентозофосфатный цикл, цикл метионина и многие другие [6]. Эти в основном взаимозависимые метаболические пути позволяют клеткам производить энергию, а также компоненты для синтеза белков, липидов и нуклеотидов, необходимые для эффективного функционирования иммунных клеток. При этом магистральными биоэнергетическими путями иммунцитов являются гликолиз и окислительное фосфорилирование.

Для анализа показателей гликолиза и окислительного фосфорилирования разработаны различные методы [1, 5, 7]. Среди них новейшим является детекция внеклеточных потоков с использованием анализатора Seahorse XF (Agilent Technologies, США). Данный прибор способен в режиме реального времени оценивать уровень внеклеточного закисления (*англ.* extracellular acidification rate, ECAR) и потребления кислорода (*англ.* oxygen consumption rate, OCR) — показатели, отражающие интенсивность гликолиза и окислительного фосфорилирования соответственно.

Для исследования гликолиза на анализаторе Seahorse XF производителем разработан специальный тест-набор Glycolytic Rate Assay Kit (Agilent Technologies, США) [4]. В его состав входят ротенон (Rot), антимицин А (AA) и 2-дезоксид-D-глюкоза (2-DG). В ходе исследования анализатор Seahorse XF фиксирует базальные показатели ECAR, после чего автоматически вносит к клеткам раствор, содержащий смесь Rot/AA — ингибиторов комплексов I и III электрон-транспортной цепи (ЭТЦ) митохондрий. Эти вещества подавляют митохондриальное дыхание, что обычно приводит к увеличению скорости гликолиза до максимально возможных для исследуемых клеток значений. Затем к клеткам вносится аналог глюкозы 2-DG, который ограничивает скорость гликолиза до минимальных значений путем конкурентного связывания с гексокиназой. Разница между максимальными и минимальными показателями закисления среды отражает гликолитический потенциал клеток.

Для исследования окислительного фосфорилирования на анализаторе Seahorse XF производителем также разработан тест-набор Cell Mito Stress Test Kit (Agilent Technologies, США) [4]. В его состав входят олигомицин, карбонилцианид-4 (трифторметокси) фенилгидразон (FCCP) и смесь Rot/AA. В процессе исследования анализатор Seahorse XF фиксирует показатель OCR на базальном уровне, после чего автоматически вносит к клеткам ингибитор АТФ-синтазы — олигомицин. В его присутствии интенсивность дыхания, сопряженного с синтезом АТФ, снижается, а скорость потребления кислорода падает. Последующее добавление протонофора FCCP приводит к утечке протонов и снижению трансмембранного потенциала митохондрий, в результате чего потребление кислорода усиливается до максимально возможного для этих клеток значений. На последнем этапе смесь ингибиторов Rot/AA угнетает работу ЭТЦ. Такое исследование позволяет получить информацию не только об активности окислительного фосфорилирования, но и о резервной дыхательной емкости клеток.

Хотя некоторые компоненты двух наборов идентичны друг другу, их комбинирование для одновременного исследования нескольких метаболических путей не предусмотрено, что увеличивает трудоемкость и стоимость разностороннего исследования, повышает требования к количеству биоматериала и вероятность ошибки при его обработке. **Цель работы** — оценить возможность одновременного исследования гликолиза и окислительного фосфорилирования с использованием тест-наборов Seahorse XF.

Материалы и методы

В исследовании приняли участие здоровые добровольные доноры крови ($n = 4$) в возрасте 25–32 лет. Были использованы три варианта тестов: 1) Glycolytic Rate Assay; 2) Cell Mito Stress Test; 3) комбинированный тест, подразумевающий последовательное внесение 4 растворов ингибиторов: олигомицина, FCCP, Rot/AA и 2-DG.

Кровь в объеме до 36 мл забирали из локтевой вены в пробирки, обработанные этилендиаминтетрауксусной кислотой (Guangzhou Improve Medical Instruments Co., Ltd, Китай). Мононуклеарные клетки выделяли с использованием стандартного протокола путем центрифугирования периферической крови в градиенте плотности Диаколл (1,077 г/мл, ООО «Диаэм», Россия) и отмывания полученных образцов раствором фосфатно-солевого буфера Дульбекко (DPBS; Gibco, США). Для проведения исследования клетки ресуспендировали в среде XF RPMI Medium (Agilent Technologies, США), содержащей 10 мМ глюкозы (Sigma, США), 2 мМ глутамин (ООО «Диаэм», Россия) и 1 мМ пирувата натрия (Sigma, США). Затем вносили по 40 мкл (200 тыс.) ресуспендированных клеток в лунки микропланшета Seahorse XF (Agilent Technologies, США), предварительно обработанные поли-D-лизином (Sigma, США): в среднем по 8 лунок для каждого донора на один тест. Для образования монослоя клеток планшет центрифугировали в течение 4 мин при 200 g (Ac 4, Dc 1). После этого доводили объем до 150 мкл средой XF RPMI Medium. Планшет инкубировали 60 мин при +37 °C в термостате. Растворы ингибиторов загружали в порты гидратированного сенсорного картриджа согласно схеме (табл. 1).

Технические повторности для каждого донора усредняли. Достоверность различий между группами устанавливали с использованием t-критерия Уэлча. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Проведение статистических расчетов осуществляли при помощи программного обеспечения GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, США). Данные на графиках представлены в виде средних и стандартных ошибок средних.

ТАБЛИЦА 1. СХЕМА ЗАГРУЗКИ ПОРТОВ КАРТРИДЖА ДЛЯ ТРЕХ ТЕСТОВ

TABLE 1. CARTRIDGE PORT LOADING SCHEME FOR THREE TESTS

Порт картриджа Cartridge port	Анализ гликолитической скорости Glycolytic Rate Assay		Тест на стресс митохондрий Cell Mito Stress Test		Комбинированный тест Combined test	
	Ингибитор Inhibitor	Конечная концентрация, мкМ Final concentration, μ M	Ингибитор Inhibitor	Конечная концентрация, мкМ Final concentration, μ M	Ингибитор Inhibitor	Конечная концентрация, мкМ Final concentration, μ M
Порт А Port A	Rot/AA	0,5	Олиго-мицин Oligomycin	2,0	Олиго-мицин Oligomycin	2,0
Порт В Port B	2-DG	50,0	FCCP	2,5	FCCP	2,5
Порт С Port C	—	—	Rot/AA	0,5	Rot/AA	0,5
Порт D Port D	—	—	—	—	2-DG	50,0

Примечание. Rot/AA – ротенон/антимицин А; 2-DG – 2-дезоксид-Д-глюкоза; FCCP – карбонилцианид-4 (трифторметокси) фенилгидразон.

Note. Rot/AA, rotenone/antimycin A; 2-DG, 2-deoxy-D-glucose; FCCP, carbonyl cyanide-4 (trifluoromethoxy)phenylhydrazine.

Результаты и обсуждение

Было установлено, что объединение тестов Glycolytic Rate Assay и Cell Mito Stress Test не оказывает статистически значимого влияния на фиксируемые показатели гликолиза и окислительного фосфорилирования. Так, при оценке базальных значений – до воздействия ингибиторов – как ECAR, так и OCR в оригинальных тестах не отличались от комбинированного варианта ($p < 0,05$) (рис. 1А, Г). Базальные ECAR и OCR позволяют оценить потребность в энергии у клеток в исходных условиях. Отсутствие статистически значимых различий между результатами оригинального и комбинированного тестов подтверждает обоснованность использования данных, полученных после введения ингибиторов, для последующих сравнительных анализов.

Установлено, что максимальная скорость гликолиза, рассчитанная как разница между показателями, полученными после добавления Rot/AA и 2-DG, в комбинированном тесте не отличается от таковой в оригинальном тесте Glycolytic Rate Assay ($p < 0,05$; рис. 1Б). В свою очередь, максимальная скорость окислительного фосфорилирования, определяемая как разница между измерениями после введения FCCP и Rot/AA, в комбинированном тесте также не отличается от значений Cell Mito Stress Test ($p < 0,05$) (рис. 1Д).

Сравнительный анализ выявил отсутствие статистически значимых различий в параметрах компенсаторного гликолиза и резервной дыхательной емкости (англ. Spare respiratory capacity,

SRC) между оригинальными и комбинированными тестами ($p < 0,05$; рис. 1В, Е). Оба показателя рассчитывались как разница между максимальными и базальными значениями.

Таким образом, с использованием системы Seahorse XF возможно проводить анализ гликолиза и окислительного фосфорилирования одновременно. Отсутствие статистически значимых различий между отдельными и комбинированными тестами подтверждает возможность их мультиплексирования без потери точности. Это приобретает особую значимость в контексте изучения патологических состояний клеток и организма, учитывая, что метаболические нарушения нередко свидетельствуют о клеточной дисфункции [3]. Так, измерение максимальной гликолитической и дыхательной емкости служит инструментом для оценки адаптационного потенциала клеток. В исследовании мутантных клеток PITX2, ассоциированных с мерцательной аритмией, анализ максимальных значений ECAR выявил сохранение гликолитического пути в мутантных кардиомиоцитах предсердий на уровне контроля [2]. Однако при воздействии FCCP или β -адренергической стимуляции эти клетки демонстрировали недостаточную биоэнергетическую эффективность, что указывает на нарушение функции митохондрий. Расчет компенсаторного гликолиза и SRC позволяет анализировать метаболические резервы клеток и их стрессоустойчивость. Например, в модели гиперинсулинемии и гипергликемии у клапанных интерстициальных клеток отмечено синхронное

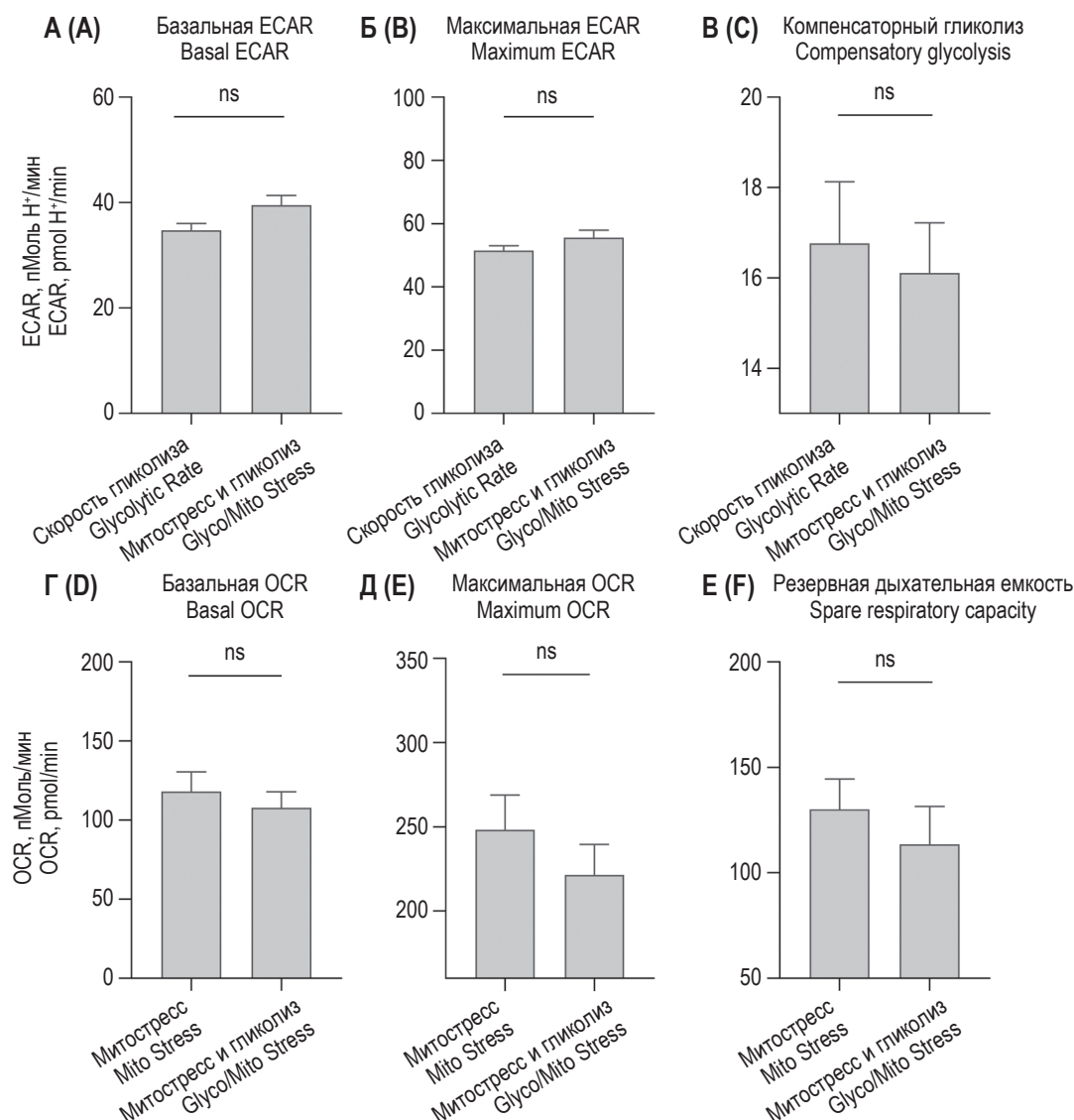


Рисунок 1. Сравнение параметров гликолиза и окислительного фосфорилирования при проведении оригинальных и комбинированных тестов

Примечание. Указаны средние и стандартные ошибки средних. Достоверность различий между группами устанавливали с использованием t-критерия Уэлча.

Figure 1. Comparison of glycolysis and oxidative phosphorylation parameters between original and combined tests

Note. The graph displays mean values with standard error bars. Statistical significance was determined using Welch's t-test to evaluate differences between groups.

увеличение как компенсаторного гликолиза, так и резервной дыхательной емкости при нормальном уровне глюкозы с гиперинсулиемией, а также при изолированной гипергликемии [9]. Эти данные, наряду с базальными и максимальными значениями ECAR и OCR, позволили сделать вывод, что гликолитическая и митохондриальная функции клапанных интерстициальных клеток не нарушается в условиях диабета.

Выводы

Таким образом, одновременное использование компонентов тест-наборов Glycolytic Rate

Assay Kit и Cell Mito Stress Test Kit обеспечивает комплексный анализ метаболических параметров иммунных клеток, включая базальные, максимальные и резервные показатели гликолиза и окислительного фосфорилирования. Комбинированный тест демонстрирует сохранение точности результатов при сокращении объема биологического материала и минимизации ошибок, связанных с его обработкой. Это, в свою очередь, может привести к снижению экономических затрат, оптимизации временных ресурсов и повышению эффективности метаболических исследований. Комплексный подход в измерении

гликолиза и окислительного фосфорилирования может найти широкое применение в анализе функциональных различий между клеточными популяциями, а также в оценке влияния фармакологических агентов и других факторов на их метаболическую активность. Кроме того, комбинированный подход позволит эффективно исследовать метаболические аспекты активации и

пролиферации иммунных клеток, а также клеток опухолей.

Благодарности

Авторы выражают глубокую благодарность заведующей лабораторией молекулярной иммунологии ИЭГМ УрО РАН Е.В. Сайдаковой.

Список литературы / References

1. Радыгина Т.В., Петричук С.В., Курбатова О.В., Купцова Д.Г., Потапов А.С. Определение ферментов гликолиза и окислительного фосфорилирования в лимфоцитах у пациентов с иммунозависимыми заболеваниями. *Аллергология и иммунология в педиатрии*, 2023. № 2. С. 54-56. [Radygina T.V., Petrichuk S.V., Kurbatova O.V., Kuptsova D.G., Potapov A.S. Determination of enzymes of glycolysis and oxidative phosphorylation in lymphocytes in patients with immuno-dependent diseases. *Allergologiya i immunologiya v pediatrii = Allergology and Immunology in Paediatrics*, 2023, no. 2, pp. 54-56. (In Russ.)]
2. Benzoni P., Da Dalt L., Elia N., Popolizio V., Cospito A., Giannetti F., Dell'Era P., Olesen M.S., Bucchi A., Baruscotti M., Norata G.D., Barbuti A. PITX2 gain-of-function mutation associated with atrial fibrillation alters mitochondrial activity in human iPSC atrial-like cardiomyocytes. *Front. Physiol.*, 2023, Vol. 14, 1250951. doi: 10.3389/fphys.2023.1250951.
3. Buck M.D., Sowell R.T., Kaech S.M., Pearce E.L. Metabolic instruction of immunity. *Cell*, 2017, Vol. 169, no. 4, pp. 570-586.
4. Childers G., Harry G.J. Mitochondrial stress assay and glycolytic rate assay in microglia using agilent Seahorse extracellular flux analyzers. In: Llorens J., Barenys M. (eds.). *Experimental Neurotoxicology Methods. Neuromethods*, Vol. 172. New York: Humana New York, 2021, pp. 305-324.
5. Lee H.T., Lin C.S., Pan S.C., Wu T.H., Lee C.S., Chang D.M., Tsai C.-Y., Wei Y.-H. Alterations of oxygen consumption and extracellular acidification rates by glutamine in PBMCs of SLE patients. *Mitochondrion*, 2019, Vol. 44, pp. 65-74.
6. Li X., Sun X., Carmeliet P. Hallmarks of endothelial cell metabolism in health and disease. *Cell Metab.*, 2019, Vol. 30, no. 3, pp. 414-433.
7. Li Z., Graham B.H. Measurement of mitochondrial oxygen consumption using a Clark electrode. *Methods Mol. Biol.*, 2012, Vol. 837, pp. 63-72.
8. Makowski L., Chaib M., Rathmell J.C. Immunometabolism: From basic mechanisms to translation. *Immunol. Rev.*, 2020, Vol. 295, no. 1, pp. 5-14.
9. Selig J.I., Ouwens D.M., Raschke S., Thoresen G.H., Fischer J.W., Lichtenberg A., Akhyari P., Barth M. Impact of hyperinsulinemia and hyperglycemia on valvular interstitial cells – A link between aortic heart valve degeneration and type 2 diabetes. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.*, 2019, Vol. 1865, no. 9, pp. 2526-2537.

Авторы:

Пономарева В.Н. — младший научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии Института экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук — филиала ФГБУН «Пермский федеральный исследовательский центр» Уральского отделения Российской академии наук; лаборант кафедры микробиологии и иммунологии ФГАОУ ВО «Пермский государственный национальный исследовательский университет», г. Пермь, Россия

Власова В.В. — младший научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии Института экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук — филиала ФГБУН «Пермский федеральный исследовательский центр» Уральского отделения Российской академии наук; инженер кафедры микробиологии и иммунологии ФГАОУ ВО «Пермский государственный национальный исследовательский университет», г. Пермь, Россия

Authors:

Ponomareva V.N., Junior Researcher, Laboratory of Molecular Immunology, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Perm Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences; Laboratory Assistant, Department of Microbiology and Immunology, Perm State National Research University, Perm, Russian Federation

Vlasova V.V., Junior Researcher, Laboratory of Molecular Immunology, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Perm Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences; Engineer, Department of Microbiology and Immunology, Perm State National Research University, Perm, Russian Federation

Поступила 28.03.2025

Отправлена на доработку 09.04.2025

Принята к печати 25.05.2025

Received 28.03.2025

Revision received 09.04.2025

Accepted 25.05.2025

ФЕНОТИПИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ДВАЖДЫ ПОЗИТИВНЫХ Т-КЛЕТОК В ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ УСЛОВНО ЗДОРОВЫХ ДОНОРОВ

Рубинштейн А.А.

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

Резюме. Исследования последних лет показали, что у здоровых людей при физиологической норме могут циркулировать дважды позитивные (DP) Т-клетки в небольшом количестве. Эти Т-лимфоциты происходят от циркулирующих CD4⁺ и CD8⁺Т-лимфоцитов, но отличаются коэкспрессией CD4 и CD8 на своей поверхности. По выраженности экспрессии CD4 и CD8, DP Т-лимфоциты можно подразделить на две субпопуляции: CD4^{bright}CD8^{dim} и CD4^{dim}CD8^{bright}. Фенотипические и функциональные особенности этих субпопуляций в настоящее время до конца не изучены. Цель исследования — выявить фенотипические характеристики CD4^{bright}CD8^{dim} и CD4^{dim}CD8^{bright}Т-лимфоцитов периферической крови условно здоровых доноров в зависимости от экспрессии маркеров созревания. Фенотипирование проводилось при помощи проточной цитометрии с использованием антител против поверхностных антигенов человека: CD57 (конъюгирован с FITC), CD62L (конъюгирован с ECD), CD28 (конъюгирован с PerCP/Cy5.5), CD27 (конъюгирован с Pe/Cy7), CD4 (конъюгирован с APC), CD8 (конъюгирован с APC-AF700), CD3 (конъюгирован с APC-AF750), CD45RA (конъюгирован с Pacific Blue) и CD45 (конъюгирован с Krome Orange). Сравнение производилось при помощи непараметрического U-критерия Манна—Уитни. Результаты приводились в виде медианы и интерквартильного размаха — Me (Q_{0,25}–Q_{0,75}). Общий пул DP Т-клеток составляет в рамках общей популяции CD3⁺Т-лимфоцитов 0,73% (0,42–1,61) при общей концентрации 11 кл/1μL (6–20). Процентное содержание CD4^{bright}CD8^{dim} и CD4^{dim}CD8^{bright}Т-клеток находилось в пределах 0,25% (0,18–0,44) и 0,29% (0,20–0,98) при концентрациях 4 кл/1μL (2–7) и 5 кл/1μL (2–12) соответственно. В Т-лимфоцитах с фенотипом CD4^{bright}CD8^{dim} преобладали клетки эффекторной памяти (CD45RA⁺CD62L⁺) и эффекторные клетки памяти, повторно экспрессирующие CD45RA (CD45RA⁺CD62L⁺), тогда как в CD4^{dim}CD8^{bright}Т-клетках преобладал фенотип центральной памяти (CD45RA⁺CD62L⁺). Кроме того, в популяциях CD4^{bright}CD8^{dim} и CD4^{dim}CD8^{bright}Т-клеток был отмечен пониженный уровень «наивного» фенотипа (CD45RA⁺CD62L⁺). Также было выявлено повышение экспрессии CD57 на поверхности CD4^{bright}CD8^{dim} Т-лимфоцитов с одновременным снижением CD27 и CD28 по сравнению с CD4⁺Т-клетками. В свою очередь, CD4^{dim}CD8^{bright}Т-клетки увеличивают экспрессию CD28 и уменьшают экспрессию CD57 на своей поверхности по сравнению с CD8⁺Т-клетками. DP Т-лимфоциты обладают более зрелым фенотипом и зачастую представляют собой клетки памяти.

Ключевые слова: проточная цитометрия, CD4⁺CD8⁺Т-клетки, дважды позитивные Т-клетки, созревание Т-клеток, дифференцировка Т-клеток, Т-клетки памяти

Адрес для переписки:

Рубинштейн Артем Аркадьевич
ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»
197376, Россия, Санкт-Петербург, ул. Академика
Павлова, 12.
Тел.: 8 (812) 234-16-69.
E-mail: arrubin6@mail.ru

Address for correspondence:

Artem A. Rubinstein
Institute of Experimental Medicine
12 Acad. Pavlov St
St. Petersburg
197376 Russian Federation
Phone: +7 (812) 234-16-69.
E-mail: arrubin6@mail.ru

Образец цитирования:

А.А. Рубинштейн «Фенотипическая характеристика дважды позитивных Т-клеток в периферической крови условно здоровых доноров» // Российский иммунологический журнал, 2025. Т. 28, № 3. С. 579–584. doi: 10.46235/1028-7221-17158-PCO

© Рубинштейн А.А., 2025
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

A.A. Rubinstein "Phenotypic characteristics of double-positive T cells in peripheral blood of healthy adults", Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2025, Vol. 28, no. 3, pp. 579–584. doi: 10.46235/1028-7221-17158-PCO

© Rubinstein A.A., 2025
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.46235/1028-7221-17158-PCO

PHENOTYPIC CHARACTERISTICS OF DOUBLE-POSITIVE T CELLS IN PERIPHERAL BLOOD OF HEALTHY ADULTS

Rubinstein A.A.

Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. Recent studies have shown that healthy adults have circulating double-positive (DP) T cells at small concentrations. These T cells develop from CD4⁺ and CD8⁺T cell populations and co-express CD4 and CD8 on their surface. According to the expression of CD4 and CD8 markers, the DP T cells can be divided into two subpopulations: CD4^{bright}CD8^{dim} and CD4^{dim}CD8^{bright}. The phenotypic and functional features of these subpopulations are currently not fully understood. The aim of the study was to identify the phenotypic characteristics of CD4^{bright}CD8^{dim} and CD4^{dim}CD8^{bright}T cells in peripheral blood from healthy adults depending on the expression of maturation antigens. The cell phenotyping was performed by flow cytometry using antibodies against the following human surface antigens: CD57 (FITC-conjugated), CD62L (ECD-conjugated), CD28 (PerCP/Cy5.5-conjugated), CD27 (Pe/Cy7-conjugated), CD4 (APC-conjugated), CD8 (APC-AF700-conjugated), CD3 (APC-AF750-conjugated), CD45RA (Pacific Blue-conjugated), and CD45 (Krome Orange-conjugated). The differences between the groups were estimated using Mann–Whitney U test. Results were presented as median and interquartile range — Me (Q_{0.25}–Q_{0.75}). A total pool of DP T cells was detected, constituting 0.73% (0.42–1.61) of the total CD3⁺T cell population, at a total concentration of 11 cells/μL (6–20). The percentage of CD4^{bright}CD8^{dim} and CD4^{dim}CD8^{bright}T cells was within 0.25% (0.18–0.44), and 0.29% (0.20–0.98) at concentrations of 4 cells/1μL (2–7) and 5 cells/1μL (2–12), respectively. Effector memory cells (CD45RA⁺CD62L[–]) and effector memory cells re-expressing CD45RA (CD45RA⁺CD62L⁺) were predominant in CD4^{bright}CD8^{dim} T cells, whereas central memory phenotype (CD45RA⁺CD62L⁺) prevailed among CD4^{dim}CD8^{bright}T cells. Moreover, a reduced level of the “naïve” phenotype (CD45RA⁺CD62L⁺) was noted in CD4^{bright}CD8^{dim} and CD4^{dim}CD8^{bright}T cell populations. An increase in CD57 expression on the surface of CD4^{bright}CD8^{dim}T cells with a simultaneous decrease in CD27 and CD28 was also detected as compared to CD4⁺T cells. In turn, CD4^{dim}CD8^{bright}T cells increase the expression of CD28 and decrease the expression of CD57 on their surface if compared to CD8⁺T cells. DP T cells have a more mature phenotype being often represented by memory cells.

Keywords: flow cytometry, CD4⁺CD8⁺T cells, double-positive T cells, T cell maturation, T cell differentiation, memory T cells

Данная работа выполнена при финансовой поддержке плановой темы НИР ФГБНУ «ИЭМ» FGWG-2025-0004 (рег. № 1022041101001-1).

Введение

В периферической крови человека помимо CD4⁺ и CD8⁺T-лимфоцитов обнаруживаются и дважды позитивные (англ. double-positive, DP) T-клетки, характеризующиеся одновременной экспрессией CD4 и CD8. Ранее считалось, что появление этих клеток в циркуляции указывает на сбой селекции T-лимфоцитов в тимусе, однако исследования последних лет опровергли эту теорию. Несмотря на инволюцию тимуса, с возрастом количество DP T-клеток в периферической крови человека увеличивается [1], что противоречит теории о центральном происхождении этих клеток. Более того, M. Nascimbeni и соавт. показали, что CD4⁺CD8⁺T-лимфоциты имеют сниженное количество эксцизионных колец T-клеточного рецептора (англ. T-cell receptor excision circles, TREC), и на их поверхности отсутствует молекула CD1a, отражающая ранние этапы

созревания T-лимфоцитов [8]. Таким образом, DP T-клетки, обнаруженные в циркуляции, вероятно, имеют периферическое происхождение. Современные исследования выдвигают теорию, заключающуюся в происхождении CD4⁺CD8⁺T-лимфоцитов от своих монопозитивных аналогов — CD4⁺ и CD8⁺T-клеток. Более того, если предшественником DP T-клетки выступал CD4⁺T-лимфоцит, то ее фенотип будет представлен CD4^{bright}CD8^{dim}, если же CD8⁺T-лимфоцит был предшественником — DP T-клетка будет обладать фенотипом CD4^{dim}CD8^{bright} [1]. Считается, что данное переключение фенотипа происходит после взаимодействия T-лимфоцита с антиген-презентирующей клеткой, что при распознавании антигена вызывает смещение баланса между конститутивными факторами транскрипции CD4⁺ и CD8⁺T-клеток в ту или иную сторону. Таким образом, в T-лимфоците, изначально экспрессирующим CD4, снижается экспрессия ThPOK и запускается синтез Runx3, следствием которого служит экспрессия CD8. В отличие от CD8⁺T-лимфоцитов и CD4^{dim}CD8^{bright}T-клеток, у CD4^{bright}CD8^{dim} T-лимфоцитов корецептор CD8

представлен двумя альфа-цепями. В свою очередь, CD8-позитивная Т-клетка при контакте с антигеном способна снижать экспрессию Runx3 и запускать синтез ThPOK, что вызывает переход CD8⁺Т-лимфоцита в CD4^{dim}CD8^{bright} фенотип DP Т-клетки [9]. Функции двух представленных выше субпопуляций DP Т-клеток в настоящее время до конца не изучены. Считается, что в зависимости от заболевания меняется их функциональный профиль. Так, при аутоиммунных заболеваниях DP Т-клетки оказывают иммуносупрессивное действие. Например, при системной красной волчанке эти клетки подавляют выработку аутоантител [11], а при синдроме Шегрена отрицательно коррелируют с активностью заболевания [10]. В случае инфекционных заболеваний DP Т-клетки играют защитную роль. Так, при ВИЧ-инфекции эти лимфоциты обладали высоким пролиферативным и эффекторным потенциалом, превышающим таковой их монопозитивных предшественников [2]. В свою очередь, при геморрагической лихорадке с почечным синдромом в периферической крови увеличивается количество DP Т-клеток. Причем эти лимфоциты обладают высокой экспрессией гранзима В и CD107a, что отражает их эффекторные свойства [12]. Таким образом, фенотип и функции CD4^{bright}CD8^{dim} и CD4^{dim}CD8^{bright}Т-лимфоцитов варьируются в зависимости от патологических состояний. В свою очередь, характеристики вышеперечисленных клеток при физиологической норме также оставляют ряд вопросов. **Целью этого исследования** выступало выявление фенотипических особенностей CD4^{bright}CD8^{dim} и CD4^{dim}CD8^{bright}Т-лимфоцитов в периферической крови условно здоровых доноров в зависимости от экспрессии маркеров созревания.

Материалы и методы

Объектом исследования служила периферическая кровь, полученная от 51 условно здорового добровольца (24 женщины, 27 мужчин, возраст 35 лет (27-46)). Данное исследование было одобрено этическим комитетом ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины» (протокол № 3/22 от 23.06.2022) и проводилось с информированного согласия испытуемых.

В рамках подготовки образцов периферической крови для проточной цитометрии применялась следующая комбинация моноклональных антител против поверхностных антигенов человека: CD57 (клон NC1, конъюгирован с FITC), CD62L (клон DREG56, конъюгирован с ECD), CD28 (клон CD28.2, конъюгирован с PerCP/Cy5.5), CD27 (клон 1A4CD27, конъюгирован с Pe/Cy7), CD4 (клон 13B8.2, конъюгирован с APC), CD8 (клон B9.11, конъюгирован с APC-

AF700), CD3 (клон UCHT1, конъюгирован с APC-AF750), CD45RA (клон 2H4, конъюгирован с Pacific Blue) и CD45 (клон J33, конъюгирован с Krome Orange). Все антитела применялись в соответствии с рекомендациями производителя Beckman Coulter (США). Для удаления эритроцитов использовали коммерческий буфер VersaLyse Lysing Solution (Beckman Coulter, США). По завершении разрушения эритроцитов (15 минут при комнатной температуре в темноте), в образцы добавлялись частицы для абсолютного счета Flow-Count Fluorospheres (Beckman Coulter, США) в объеме, аналогичном объему периферической крови. Сбор цитометрических данных осуществляли на проточном цитометре Navios 3/10 (Beckman Coulter, США), оснащенном программным обеспечением Navios Software 1.2 (Beckman Coulter, США). В каждом образце анализировалось не менее 60 000 CD3⁺Т-клеток периферической крови. Детальные характеристики использованных реагентов и особенности подготовки образцов для анализа были описаны нами ранее [5, 6].

Обработка полученных результатов проточной цитометрии была проведена с использованием FlowJo™ v10 474 Software (BD Bioscience Inc., США; www.flowjo.com). Статистическая обработка данных проведена с использованием программы IBM SPSS software v26 (SPSS Inc., США; www.ibm.com). Для проверки на нормальность распределения использовались критерии Шапиро–Уилка и Колмогорова–Смирнова. Достоверность различий оценена при помощи непараметрического U-критерия Манна–Уитни. Результаты статистических обчислений представлены в виде медианы и интерквартильного размаха – Me (Q_{0,25}–Q_{0,75}).

Результаты и обсуждение

В рамках проведенного исследования было обнаружено, что относительное содержание общего пула DP Т-клеток в рамках общей популяции CD3⁺Т-лимфоцитов составляет 0,73% (0,42-1,61) при общей концентрации 11 кл/1μL (6-20). Причем процентное содержание CD8^{dim}CD4^{bright} и CD4^{dim}CD8^{bright}Т-клеток находится в пределах 0,25% (0,18-0,44) и 0,29% (0,20-0,98) соответственно, при концентрациях 4 кл/1μL (2-7) и 5 кл/1μL (2-12) соответственно. Так, M.S. Gonzalez-Mancera и соавт. показали, что DP Т-клетки составляли 2,60% (1,70-3,67), тогда как уровни CD4^{high}CD8^{low} и CD4^{low}CD8^{high}Т-клеток находились в пределах 1,15% (0,80-2,00) и 0,90% (0,50-1,67) соответственно [4]. Возможно, уровни этих клеток могли увеличиваться по мере старения организма, а значения, полученные для лиц пожилого возраста, обычно превосходили

таковые у условно здоровых добровольцев более младших возрастов [3].

Далее, чтобы сравнить распределение субпопуляций DP T-клеток по созреванию и их монопозитивных аналогов, были проанализированы CD45RA и CD62L на CD8^{dim}CD4^{bright}, CD4^{dim}CD8^{bright}, CD4⁺ и CD8⁺T-клетках. Были выявлены «наивные» клетки (CD45RA⁺CD62L⁺), центральные и эффекторные клетки памяти (CD45RA⁺CD62L⁺ и CD45RA⁺CD62L⁻ соответственно) и эффекторные клетки памяти, повторно экспрессирующие CD45RA (TEMRA) с фенотипом CD45RA⁺CD62L⁻. В T-лимфоцитах с фенотипом CD8^{dim}CD4^{bright} преобладали клетки эффекторной памяти и TEMRA (64,44% (50,00-75,00) против 22,03% (16,31-26,71) среди CD4⁺T-клеток при $p < 0,001$ и 1,43% (0,00-10,71) против 0,24% (0,18-0,57) среди CD4⁺T-клеток при $p = 0,013$ соответственно) (рис. 1А, Б). В случае CD4^{dim}CD8^{bright}T-клеток преобладали клетки центральной памяти (36,00% (23,08-60,38) против 13,26% (9,36-16,89) среди CD8⁺T-клеток при $p < 0,001$) (рис. 1В, Г). Более того, в популяциях CD8^{dim}CD4^{bright} и CD4^{dim}CD8^{bright}T-клеток был отмечен пониженный уровень «наивных» клеток (2,94% (1,22-7,43) против 33,02% (24,36-42,70) среди CD4⁺T-клеток при $p < 0,001$, и 11,32% (2,35-17,28) против 39,22% (28,35-48,42) среди CD8⁺T-клеток при $p < 0,001$ соответственно) (рис. 1Б, Г). Таким образом, DP T-клетки обладают преимущественно фенотипом памяти: в CD8^{dim}CD4^{bright}T-лимфоцитах преобладает эффекторный фенотип памяти, тогда как в CD4^{dim}CD8^{bright} преобладает

фенотип центральной памяти. Эти результаты косвенно подтверждают теорию о формировании DP T-клеток на периферии после контакта с антигеном. Следует отметить, что Nascimbeni M. и соавт. показали, что CD4^{dim}CD8^{bright}T-клетки преимущественно обладают фенотипом эффекторных клеток памяти с фенотипом CCR7⁻CD45RA⁺, в то время как CD4^{bright}CD8^{dim}T-клетки в основном характеризуются фенотипом центральных клеток памяти CCR7⁺CD45RA⁻ [8]. Возможно, разница в результатах объясняется размерами выборки и возрастом доноров.

Затем на поверхности субпопуляций DP T-клеток были проанализированы коstimуляционные молекулы CD27 и CD28, а также маркер клеточного «старения» CD57. Было выявлено повышение экспрессии CD57 на поверхности CD8^{dim}CD4^{bright}T-лимфоцитов (12,90% (4,00-43,70) против 8,69% (6,36-11,73) и 1,07% (0,51-4,07) на поверхности CD4⁺T-клеток при $p < 0,001$) (рис. 2В). При этом экспрессия CD27 и CD28 на поверхности CD8^{dim}CD4^{bright}T-клеток была ниже по сравнению с CD4⁺T-клетками (91,31% (88,27-93,65) против 65,31% (27,08-75,00) и 90,80% (37,92-96,08) против 99,24% (96,38-99,83) соответственно, при $p < 0,001$ в случае обеих молекул) (рис. 2А, Б). Данные изменения могут возникать вследствие преобладания клеток эффекторной памяти в пуле CD8^{dim}CD4^{bright}T-лимфоцитов, так как эти субпопуляции могут высоко экспрессировать CD27 для поддержания выживания и снижать экспрессию коstimуляционного рецептора CD28 после контакта с анти-

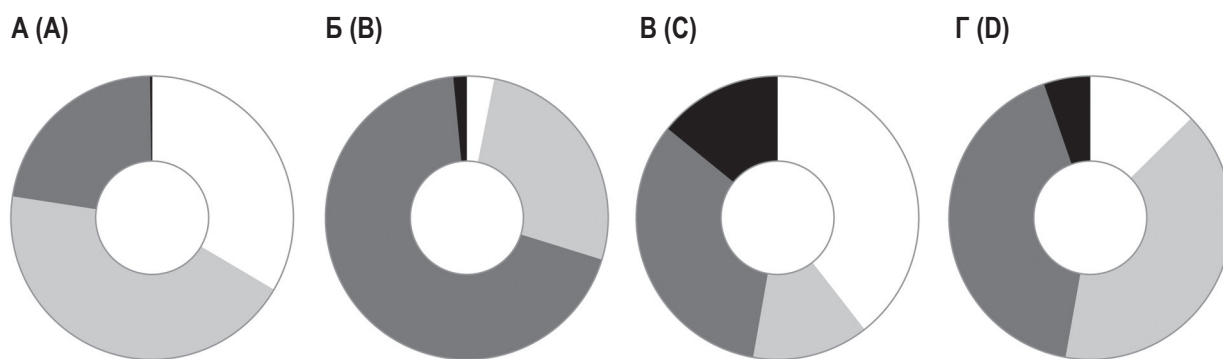


Рисунок 1. Распределение основных субпопуляций T-лимфоцитов в зависимости от экспрессии CD62L и CD45RA

Примечание. Круговые диаграммы А-Г показывают относительное количество лимфоцитов с фенотипом «наивных» клеток (CD45RA⁺CD62L⁺) – белый цвет, клеток центральной памяти (CM, CD45RA⁻CD62L⁺) – серый цвет, клеток эффекторной памяти (EM, CD45RA⁻CD62L⁻) – темно-серый цвет и терминально дифференцированных CD45RA-позитивных эффекторных клеток памяти (CD45RA⁺CD62L⁻) – черный цвет. Круговая диаграмма А показывает распределение фенотипов среди CD3⁺CD4⁺, диаграмма Б – среди CD8^{dim}CD4^{bright}, диаграмма В – относительно CD3⁺CD8⁺ и диаграмма Г – распределение фенотипов среди CD4^{dim}CD8^{bright}.

Figure 1. Distribution of the main T cell subsets depending on the expression of CD62L and CD45RA

Note. Pie charts A-D show the relative numbers of lymphocytes with the phenotype of 'naïve' cells (CD45RA⁺CD62L⁺), white; central memory cells (CM, CD45RA⁻CD62L⁺), grey; effector memory cells (EM, CD45RA⁻CD62L⁻), dark grey; terminally differentiated CD45RA-positive effector memory cells (CD45RA⁺CD62L⁻), black. Pie chart A shows the distribution of phenotypes among CD3⁺CD4⁺; chart B, among CD8^{dim}CD4^{bright}; chart C, relative to CD3⁺CD8⁺; chart D, the distribution of phenotypes among CD4^{dim}CD8^{bright}.

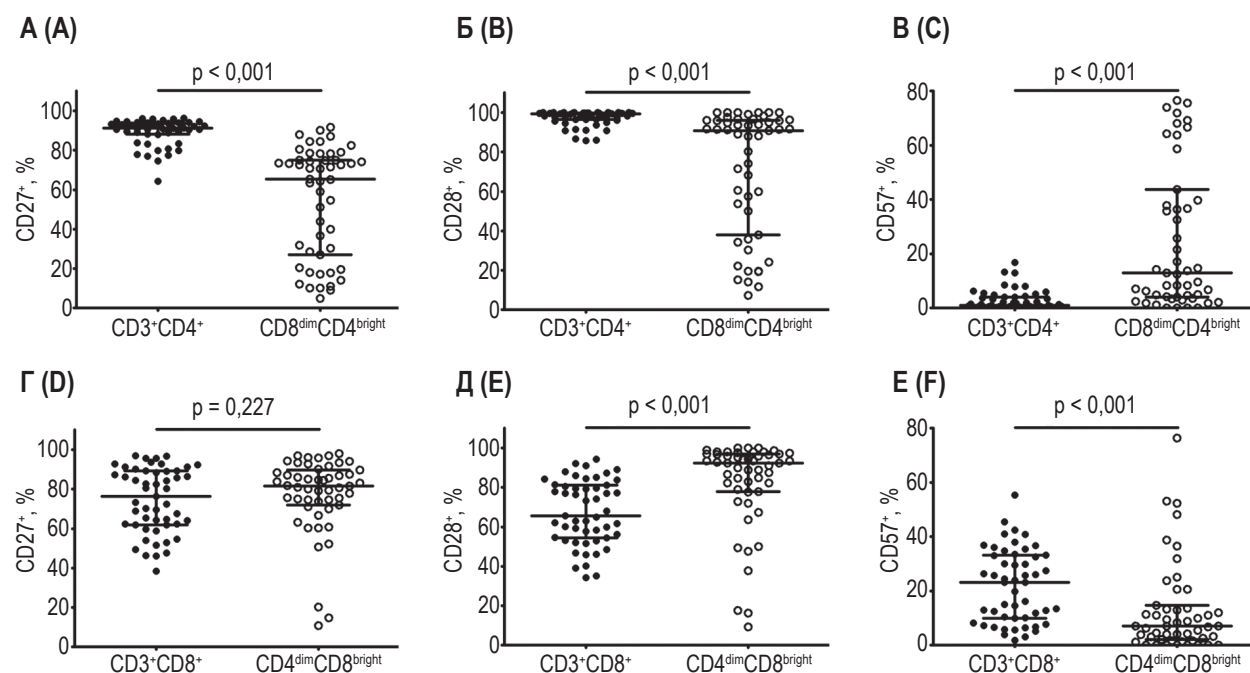


Рисунок 2. Экспрессия CD27, CD28 и CD57 субпопуляциями Т-лимфоцитов с различными паттернами экспрессии маркеров CD4 и CD8

Примечание. Гистограммы А-Е показывают относительное содержание $CD3^+CD4^+$, $CD8^{dim}CD4^{bright}$, $CD3^+CD8^+$ и $CD4^{dim}CD8^{bright}$, экспрессирующих маркеры CD27, CD28 и CD57 соответственно. Черные кружки обозначают клетки $CD3^+CD4^+$ и $CD3^+CD8^+$ на гистограммах А-В и Г-Е соответственно, белые кружки – клетки $CD8^{dim}CD4^{bright}$ и $CD4^{dim}CD8^{bright}$ на гистограммах А-В и Г-Е соответственно. Результаты представлены в виде медианы и интерквартильного размаха – Ме ($Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$); для полученных сравнения выборок использовали непараметрический U-критерий Манна–Уитни.

Figure 2. Expression of CD27, CD28 and CD57 by T cell subsets with different patterns of expression of CD4 and CD8 markers
Note. Scatter plots A-F show the relative number of $CD3^+CD4^+$, $CD8^{dim}CD4^{bright}$, $CD3^+CD8^+$ and $CD4^{dim}CD8^{bright}$ expressing markers CD27, CD28 and CD57, respectively. Black circles denote $CD3^+CD4^+$ and $CD3^+CD8^+$ cells on scatter plots A-C and D-F, respectively, white circles denote $CD8^{dim}CD4^{bright}$ and $CD4^{dim}CD8^{bright}$ cells on scatter plots A-C and D-F, respectively. The results are presented as the median and interquartile range – Me ($Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$); the nonparametric Mann–Whitney U test was used to compare the obtained samples.

геном. Стоит отметить, что CD57 также отражает содержание гранул перфорина и гранзима внутри клетки, поэтому увеличение экспрессии этого маркера на поверхности $CD8^{dim}CD4^{bright}$ Т-клеток может свидетельствовать о приобретении ими цитолитических свойств. Эти результаты согласуются с данными, полученными Nascimbeni M. и соавт., однако исследователи связывают повышение экспрессии CD57 только с терминальной дифференцировкой и репликативным старением $CD8^{dim}CD4^{bright}$ Т-клеток [8].

В свою очередь, $CD4^{dim}CD8^{bright}$ Т-лимфоциты на своей поверхности увеличивают экспрессию CD28 (92,23% (77,94–96,83) против 65,67% (54,43–81,20) на поверхности $CD8^+$ Т-клеток при $p < 0,001$) (рис. 2Д), а также характеризуются сниженной экспрессией CD57 (7,14% (2,08–14,71) против 23,22% (10–33,17) на поверхности $CD8^+$ Т-клеток при $p < 0,001$) (рис. 2Е). Мангеро У.Т. и соавт. также было показано увеличение экспрессии CD28 на поверхности $CD4^{dim}CD8^{bright}$ Т-лимфоцитов [7]. Более того, данная субпопу-

ляция могла продуцировать высокие уровни IL-4 и IFN γ [7], что косвенно может отражать снижение цитолитического потенциала в пользу цитокин-секретирующего. Экспрессия CD27 между $CD4^{dim}CD8^{bright}$ Т-лимфоцитами и $CD8^+$ Т-клетками не отличалась (81,69% (71,88–89,80) против 76,27% (61,96–89,25) соответственно, при $p = 0,227$) (рис. 2Г). По-видимому, увеличение экспрессии CD28 с одновременным снижением CD57 было связано с преобладанием пула центральной памяти среди $CD4^{dim}CD8^{bright}$ Т-клеток, что также связано с отсутствием цитолитических свойств у данной популяции клеток и сниженным уровнем CD57 $^+$ клеток.

Выводы

DP Т-клетки обладают преимущественно фенотипом памяти: $CD8^{dim}CD4^{bright}$ клетки с преобладанием эффекторной памяти, $CD4^{dim}CD8^{bright}$ клетки с преобладанием центральной. На поверхности субпопуляции $CD8^{dim}CD4^{bright}$ Т-клеток по сравнению с $CD4^+$ Т-лимфоцитами увеличивает-

ся экспрессия CD27 и CD57, в то время как экспрессия CD28 снижается, что также характеризует эффекторный фенотип памяти и приобретение цитолитической способности. На поверхности CD4^{dim}CD8^{bright}T-лимфоцитов по сравнению с CD8⁺T-лимфоцитами увеличивается экспрессия

CD28 и снижается экспрессия CD57, в то время как экспрессия CD27 статистически значимо не отличается, что также характерно для клеток памяти, преобладавшей в этой субпопуляции. Для более детальной характеристики фенотипа DP T-клеток необходимы дальнейшие исследования.

Список литературы / References

1. Alam M.R., Akinyemi A.O., Wang J., Howlader M., Farahani M.E., Nur M., Zhang M., Gu L., Li Z. CD4⁺CD8⁺ double-positive T cells in immune disorders and cancer: Prospects and hurdles in immunotherapy. *Autoimmun. Rev.*, 2025, Vol. 24, no. 3, pp. 103757. doi: 10.1016/j.autrev.2025.103757.
2. Frahm M.A., Picking R.A., Kuruc J.D., McGee K.S., Gay C.L., Eron J.J., Hicks C.B., Tomaras G.D., Ferrari G. CD4⁺CD8⁺ T cells represent a significant portion of the anti-HIV T cell response to acute HIV infection. *J. Immunol.*, 2012, Vol. 188, no. 9, pp. 4289-4296.
3. Ghia P., Prato G., Stella S., Scielzo C., Geuna M., Caligaris-Cappio F. Age-dependent accumulation of monoclonal CD4⁺CD8⁺ double positive T lymphocytes in the peripheral blood of the elderly. *Br. J. Haematol.*, 2007, Vol. 139, no. 5, pp. 780-790.
4. Gonzalez-Mancera M.S., Bolanos N.I., Salamanca M., Orjuela G.A., Rodriguez A.N., Gonzalez J.M. Percentages of CD4⁺CD8⁺ Double-positive T Lymphocytes in the Peripheral Blood of Adults from a Blood Bank in Bogota, Colombia. *Turk. J. Haematol.*, 2020, Vol. 37, no 1, pp. 36-41.
5. Kudryavtsev I., Zinchenko Y., Serebriakova M., Akisheva T., Rubinstein A., Savchenko A., Borisov A., Belenjuk V., Malkova A., Yablonskiy P., Kudlay D., Starshinova A. A key role of CD8⁺ T cells in controlling of tuberculosis infection. *Diagnostics (Basel)*, 2023, Vol. 13, no. 18, 2961. doi: 10.3390/diagnostics13182961.
6. Kudryavtsev I.V., Arsentieva N.A., Korobova Z.R., Isakov D.V., Rubinstein A.A., Batsunov O.K., Khamitova I.V., Kuznetsova R.N., Savin T.V., Akisheva T.V., Stanevich O.V., Lebedeva A.A., Vorobyov E.A., Vorobyova S.V., Kulikov A.N., Sharapova M.A., Pevtsov D.E., Totolian A.A. Heterogenous CD8⁺ T cell maturation and 'polarization' in acute and convalescent COVID-19 patients. *Viruses*, 2022, Vol. 14, no. 9, 1906. doi: 10.3390/v14091906
7. Marrero Y.T., Suárez V.M., Abraham C.M.M., Hernández I.C., Ramos E.H., Domínguez G.D., Pérez Y.D., Zamora M.C.R., Guerra L.F.H. Immunophenotypic characterization of double positive T lymphocytes in Cuban older adults. *Exp. Gerontol.*, 2021, Vol. 152, 111450. doi: 10.1016/j.exger.2021.111450.
8. Nascimbeni M., Shin E.C., Chiriboga L., Kleiner D.E., Rehmann B. Peripheral CD4⁺CD8⁺ T cells are differentiated effector memory cells with antiviral functions. *Blood*, 2004, Vol. 104, no. 2, pp. 478-486.
9. Schad S.E., Chow A., Mangarin L., Pan H., Zhang J., Ceglia N., Caushi J.X., Malandro N., Zappasodi R., Gigoux M., Hirschhorn D., Budhu S., Amisaki M., Arniella M., Redmond D., Chaft J., Forde P.M., Gainor J.F., Hellmann M.D., Balachandran V., Shah S., Smith K.N., Pardoll D., Elemento O., Wolchok J.D., Merghoub T. Tumor-induced double positive T cells display distinct lineage commitment mechanisms and functions. *J. Exp. Med.*, 2022, Vol. 219, no. 6, e20212169. doi: 10.1084/jem.20212169.
10. Wang S., Shen H., Bai B., Wu J., Wang J. Increased CD4⁺CD8⁺ Double-positive T cell in patients with primary Sjögren's syndrome correlated with disease activity. *J. Immunol. Res.*, 2021, Vol. 2021, 6658324. doi: 10.1155/2021/6658324.
11. Wu Y., Cai B., Feng W., Yang B., Huang Z., Zuo C., Wang L. Double positive CD4⁺CD8⁺ T cells: key suppressive role in the production of autoantibodies in systemic lupus erythematosus. *Indian J. Med. Res.*, 2014, Vol. 140, no. 4, pp. 513-519.
12. Zhang H., Wang Y., Ma Y., Tang K., Zhang C., Wang M., Zhang X., Xue M., Jia X., Hu H., Li N., Zhuang R., Jin B., Chen L., Zhang Y., Zhang Y. Increased CD4⁺CD8⁺ double positive T cells during Hantaan virus infection. *Viruses*, 2022, Vol. 14, no. 10, 2243. doi.org/10.3390/v14102243.

Автор:

Рубинштейн А.А. — врач общей практики, младший научный сотрудник лаборатории клеточной иммунологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Author:

Rubinstein A.A., General Practitioner, Junior Researcher, Department of Cellular Immunology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Поступила 28.03.2025

Отправлена на доработку 10.05.2025

Принята к печати 25.05.2025

Received 28.03.2025

Revision received 10.05.2025

Accepted 25.05.2025

СИСТЕМА CSF-1/CSF1R КАК ПРЕДИКТОР ЖИВОРОЖДЕНИЯ ПОСЛЕ ИНДУЦИРОВАННОЙ БЕРЕМЕННОСТИ

Лапштаева А.В.¹, Сычев И.В.², Адамчик А.И.³

¹ ФГБОУ ВО «Национальный исследовательский Мордовский государственный университет имени Н.П. Огарева», г. Саранск, Республика Мордовия, Россия

² ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

³ ГБУЗ Республики Мордовия «Мордовская республиканская центральная клиническая больница», г. Саранск, Республика Мордовия, Россия

Резюме. Эффективность процедуры ЭКО оценивается не только показателями наступления клинической беременности, но и долей живорождений, поскольку около трети беременностей завершаются прерыванием, что безусловно, определяется многими факторами. Колонистимулирующие факторы можно рассматривать как потенциальные прогностические маркеры развития индуцированной беременности и последующего живорождения. Цель исследования — оценить прогностическую значимость системы CSF-1 (сывороточной концентрации CSF-1 и носительство полиморфизмов гена *CSF1R*) в рамках завершения ЭКО-индуцированной беременности родами у женщин с трубно-перитонеальным бесплодием. 88 пациенток, проходящих процедуру ЭКО, в возрасте от 25 до 40 лет были разделены на группы: I группа (n = 32) — пациентки, беременность после процедуры ЭКО у которых завершилась родами в срок от 24 недели и более, II группа (n = 52) — пациентки, у которых беременность не наступила или закончилась самопроизвольным выкидышем. Методом иммуноферментного анализа двукратно было определено содержание CSF-1: на 3–4-й день менструального цикла, предшествующего процедуре ЭКО, и на 15-й день после переноса эмбрионов. Генотипирование по полиморфным маркерам rs3216780 и rs386693509 гена *CSF1R* было проведено методом полимеразной цепной реакции с секвенированием по Сенгеру. Содержание CSF-1 увеличилось на 15-й день после переноса эмбриона (в 3,9 раза для I группы и в 1,8 раза для II группы) и у пациенток, беременность из группы II, содержание CSF-1 было достоверно выше, чем в группе сравнения (p = 0,0017). Наибольший процент женщин, беременность которых закончилась родами, были носителями генотипа *del/G* rs3216780 и *TG/CA* rs386693509 гена *CSF1R*. При однофакторном анализе были выявлены следующие предикторы завершения индуцированной беременности родами — уровень CSF-1 в периферической крови от 121,3 до 314,8 пг/мл на прекоцептивном этапе и от 963,3 до 1682,8 пг/мл — на 15-й день после переноса эмбрионов, а также носительство генотипов *del/G* rs3216780 и *TG/CA* rs386693509 гена *CSF1R*. В сочетании данные предикторы отмечались у 66,7% женщин из I группы и у 7,7% из II группы. Система CSF-1 играет важную роль в реализации репродуктивной функции женщины и вы-

Адрес для переписки:

Лапштаева Анна Васильевна
ФГБОУ ВО «Мордовский государственный
университет имени Н.П. Огарева»
430005, Россия, Республика Мордовия,
г. Саранск, ул. Большевикская, 68.
Тел.: 8 (927) 177-35-55.
E-mail: av_lapshtaeva@mail.ru

Address for correspondence:

Anna V. Lapshtaeva
National Research Ogarev Mordovia State University
68 Bolshhevistskaya St
Saransk, Republic of Mordovia
430005 Russian Federation
Phone: +7 (927) 177-35-55.
E-mail: av_lapshtaeva@mail.ru

Образец цитирования:

А.В. Лапштаева, И.В. Сычев, А.И. Адамчик «Система CSF-1/CSF1R как предиктор живорождения после индуцированной беременности» // Российский иммунологический журнал, 2025. Т. 28, № 3. С. 585–590. doi: 10.46235/1028-7221-17199-CCS

© Лапштаева А.В. и соавт., 2025
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

A.V. Lapshtaeva, I.V. Sychev, A.I. Adamchik “CSF-1/CSF1R system as predictor of live birth after induced pregnancy”, Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2025, Vol. 28, no. 3, pp. 585–590. doi: 10.46235/1028-7221-17199-CCS

© Lapshtaeva A.V. et al., 2025
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.46235/1028-7221-17199-CCS

явленные прогностические показатели — сывороточная концентрация CSF-1 на преконцептивном этапе и на 15-й день после переноса эмбрионов, а также носительство генотипов *del/G rs3216780* и *TG/CA rs386693509* гена *CSF1R*, могут быть использованы в качестве предикторов завершения индуцированной беременности родами.

Ключевые слова: экстракорпоральное оплодотворение, роды, индуцированная беременность, цитокины, колониестимулирующий фактор-1, макрофагальный колониестимулирующий фактор, *CSF1*, полиморфизм *CSF1R*, *rs3216780*, *rs386693509*

CSF-1/CSF1R SYSTEM AS PREDICTOR OF LIVE BIRTH AFTER INDUCED PREGNANCY

Lapshtaeva A.V.^a, Sychev I.V.^b, Adamchik A.I.^c

^a National Research Ogarev Mordovia State University, Saransk, Republic of Mordovia, Russian Federation

^b Russian Medical Academy of Continuous Professional Education, Moscow, Russian Federation

^c Mordovia Republican Central Clinical Hospital, Saransk, Republic of Mordovia, Russian Federation

Abstract. Efficiency of the IVF procedure is assessed not only by the indexes of clinical pregnancy onset but also by the proportion of live births, since about a third of pregnancies end in termination, which certainly depends on many factors. Colony-stimulating factors may be considered potential predictive markers of the induced pregnancy development and resulting into live birth. To evaluate the predictive value of the CSF-1 system (serum CSF-1 concentration and carriage of *CSF1R* gene polymorphisms) in the setting of live birth after IVF-induced pregnancy in women with tubo-peritoneal infertility. 88 patients undergoing IVF aged between 25 and 40 years were assigned to the following groups: Group I (n = 32): patients whose post-IVF pregnancies resulted in live births at Week 24 or later; and Group II (n = 52) which included patients whose pregnancies did not occur or resulted in spontaneous miscarriages. ELISA testing determined the CSF-1 levels twice: on pre-IVF menstrual cycle (Days 3–4), and on post-embryo-transfer (Day 15). Genotyping of the *CSF1R* gene *rs3216780* and *rs386693509* polymorphic markers was performed by PCR with subsequent Sanger sequencing. CSF-1 levels risen to post-embryo-transfer Day 15 (3.9-fold in Group I and 1.8-fold in Group II); the appropriate values in pregnant women of Group II were reliably higher than in comparison group (p = 0.0017). Most women whose pregnancy resulted in live births carried the *del/G rs3216780* and *TG/CA rs386693509* genotypes of *CSF1R* gene. Univariate analysis identified the following predictors for completion of induced pregnancy by delivery: (1) CSF-1 levels in peripheral blood from 121.3 to 314.8 pg/mL at the preconceptional stage, and 963.3 to 1682.8 pg/mL on Day 15 after embryo transfer; (2) harboring the *del/G rs3216780* genotypes and *TG/CA rs386693509* gene *CSF1R*. In combination. These predictors were observed in 66.7% of women from group I and in 7.7% from group II. The CSF-1 system plays an important role in performance of female reproductive function and the revealed prognostic indicators, i.e., pre-conception and post-ET Day 15 serum CSF-1 concentrations, and carriage of the following *CSF1R* gene variants: *del/G rs3216780* and *TG/CA rs386693509* genotypes which can be used as predictors of the completion of induced pregnancy by childbirth.

Keywords: *in vitro* fertilization, live birth, induced pregnancy, cytokines, colony-stimulating factor-1, *CSF1*, *CSF1R* polymorphism, *rs3216780*, *rs386693509*

Introduction

In vitro fertilization (IVF) is one of the most popular infertility treatment method. However, when assessing its effectiveness, on average, about a third of the protocols lead to pregnancy, and of these, about 70% result in live births [5]. This problem stimulates researchers to identify new informative factors influencing the success of IVF. As the factors of the immune system are directly involved in the realization of reproductive functions, its components can be considered potential predictive markers of the induced pregnancy development and resulting live birth [3, 11].

Colony-stimulating factors form a family of cytokines that regulate the differentiation and proliferation of hematopoietic progenitor cells. Thus, colony-stimulating factor-1 (CSF-1) regulates the proliferation, differentiation, and survival of macrophages; supports the growth and proliferation of extravillous trophoblastic cells; plays an important role in embryo implantation in the uterus and subsequent placental growth [1, 12, 14]. A reduced number of cells or poor development of trophoblast can induce alterations in the placental structure and nutrient transport function — these lead to pregnancy loss or disturbed development [1]. In addition, CSF-1 is an embryotrophic factor: it favors the development of the

blastocyst by increasing the number of blast cells and gene expression [2]. The CSF-1's biologic effects are implemented via its binding with the specific CSF1R receptor; this leads to its dimerization, activation of the tyrosine kinase and signaling cascade [4, 8, 12, 13]. Trophoblast expresses CSF and CSF1R more than any other non-macrophage-derived cell types do. The placental development depends upon the CSF signaling, as CSF stimulates the proliferation of the placental cells, the differentiation of the cytotrophoblastic cells, and regulates the pre-implantation division of the blastocystic cells. The total role of CSF in the development of the induced pregnancy is under study, yet [1].

The objective of this study is to evaluate the predictive value of the CSF-1 system (serum CSF-1 concentration and carriage of *CSF1R* gene polymorphisms) components in the setting of live birth after IVF-induced pregnancy in women with tuboperitoneal infertility.

Materials and methods

Ethical considerations

The Institutional Review Board at a large public university approved the research. All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of the institutional and/or national research committee and with the 1964 Helsinki Declaration and its later amendments or comparable ethical standards. Written informed consent was obtained from all individual participants involved in the study. The study was approved by the local ethics committee of Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education "National Research Ogarev Mordovia State University" protocol No. 68 of 31.03.2015.

Study population

Based on the inclusion, non-inclusion, and exclusion criteria, this study involved 88 women with tuboperitoneal infertility aged 25 to 35 years, with an average age of 28.7 ± 2.9 years, who were treated from June 2022 to December 2023 at the Department of Assisted Reproductive Technologies of the Perinatal Center of the State Budgetary Healthcare Institution of the Republic of Mordovia "Mordovia Republican Central Clinical Hospital" (Saransk). Criteria for inclusion were: signed informed consent for enrollment; current tuboperitoneal infertility factor; normal ovarian reserve; regular menstrual cycle; normal karyotype of both spouses; fertile semen in partner/husband; and transfer of only-good-quality embryos. Criteria for non-inclusion were: patients with other forms of infertility, acute genital or extragenital diseases, as well as exacerbated chronic diseases. Criteria for exclusion were: voluntary withdrawal of patient from study at any stage.

All the patients received the "short-protocol" superovulation stimulation, which involved using the recombinant follicle-stimulating hormone and gonadotropin-releasing hormone antagonists. All

the patients had only-good-quality fresh embryos transferred into the uterine cavity under ultrasonic control on Days 5-6 of cultivation. Diagnosis of pregnancy was based on determining the serum concentration of the human chorionic gonadotropin β -subunit on post-embryo-transfer (ET) into uterine cavity Day 15 and ultrasounding on Day 21 to assess for the presence of one or two fetal eggs in the uterine cavity. Live birth was defined as the child born alive after 24 weeks of pregnancy and having survived more than 1 month. The facts of live birth were to be confirmed by personal observation and data from the clinical records of the postpartum women. Miscarriage was defined as the loss of pregnancy before 28 weeks.

Depending on the outcomes the patients were assigned to two groups. Group I consisted of the 36 women whose pregnancies resulted in live births, mean age 28.6 ± 3.1 years. Group II consisted of the 52 patients whose pregnancies did not occur or resulted in spontaneous miscarriages, mean age 29.3 ± 2.7 years. The study groups were comparable in terms of age, reproductive function and past gynecological diseases ($p > 0.05$).

Serological testing

To study the serum concentration of cytokines, venous blood was collected aseptically by venipuncture from the cubital vein in the morning on an empty stomach in a volume of 10 mL, obtained using a VACUETTE® vacuum system (GreinerBio-One, Austria) into tubes with a coagulation activator. The blood was centrifuged for 15 minutes at 2000 g, the supernatant liquid was collected into Eppendorf tubes and frozen at a temperature of -30°C . Storage at a temperature of -40 – -60°C in the refrigerator for up to 6 months. The samples were not thawed and re-frozen.

Blood from the peripheral vein was sampled twice during the IVF procedure. The first sampling was performed on pre-IVF menstrual cycle Days 3-4 (pre-conception stage), while the second sample was taken on post-embryo-transfer (ET) into uterine cavity Day 15. Serum CSF-1 concentration was determined by ELISA using kits from R&D Systems (USA) with a Personal Lab (Adaltis, Italy) immunoassay analyzer.

Sequence-based genotyping

The material for the genetic study was venous blood in a volume of 5 mL, obtained using a VACUETTE® vacuum system (GreinerBio-One, Austria) into tubes with EDTA (ethylenediaminetetraacetate). Storage of whole blood -80°C , transportation at -20°C .

Genomic DNA was isolated from whole blood with the help of a QIAamp DNA Mini Kit at a QIAcube automated nucleic acid isolation station (QIAGEN, Germany). The rs3216780 and rs386693509 dinucleotide polymorphisms in the *CSF1R* gene UTR-3 region were examined with Sanger sequencing. The primers for the *CSF1R* gene amplification were selected using the Primer-BLAST Internet resource (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>) and the NG_012303.1 reference nucleotide sequence from the NCBI Database (<http://www.ncbi.nlm.nih>).

gov/nucore/NG_012303.1). The sequencing of the purified PCR products used an ABI PRISM 3500 analyzer (Thermo Fisher Scientific, USA) with a Big Dye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, USA). The nucleotide sequences were analyzed using the Sequence Scanner v. 1.0. Peak Trace, Vector NTI Advance 10, and Chromas Lite 2.1.1 software packages.

Statistical analysis

The statistical analysis of the findings used the Stat Soft Statistica 12.0 (USA) application software package. The distribution of quantitative data corresponded to the normal distribution, and therefore were expressed as the arithmetic mean with the standard deviation, and the Student's t-test was used to analyze the differences between groups. The qualitative values are presented as the absolute values (n) and percentages. To assess the associations of the factors with the procedure outcome, the Pearson's χ^2 test and the odds ratio (OR) with a 95% confidence interval (CI) were used. The significance level of the revealed differences and correlations in all the types of analysis was assumed to be $p < 0.05$. The distribution of the allele frequencies and genotypes of polymorphic variants complied with the Hardy–Weinberg equilibrium.

Results and discussion

The pre-conception CSF-1 levels did not significantly differ between the groups ($p = 0.730$); nevertheless, the over-time CSF-1 assessment found that on post-ET Day 15 women in both groups showed a reliably higher CSF-1 (3.9-fold in Group I ($p < 0.0001$) and 1.8-fold in Group II ($p = 0.012$), while the Group I patients had a reliably higher CSF-1 than those of the comparison group ($p < 0.0001$).

To assess the possible effects of the serum CSF-1 level on the post-IVF live births, an interquartile analysis was performed. Table 1 shows the isolated CSF-1 quartiles (Me ($Q_{0.25}$ – $Q_{0.75}$)). The CSF-1 concentrations corresponding to the 1st and 2nd pre-conception quartiles and the 3rd and 4th post-ET Day 15 quartiles associated with the maximal numbers of the post-IVF live births.

To evaluate the predictive value of the CSF-1 concentrations, the odds ratio with a 95% confidence interval was calculated, and the sensitivities and specificities of the identified predictors of live births were determined. Patients with 121.3 to 314.8 pg/mL pre-conception peripheral blood CSF-1 had 6.18-fold higher odds of live birth at induced pregnancy (95% CI = 2.386–15.990, $p < 0.001$, sensitivity: 75%, specificity: 67.3%). Post-ET Day 15 CSF-1 963.3 to 1682.8 pg/mL supposes 71.4-fold higher odds of post-IVF live birth (95% CI = 14.646–348.073, $p < 0.05$, Complies with Fisher's exact test, sensitivity: 94.4%, specificity: 80.8%).

In the setting of the analysis of the gene *CSF1R* rs3216780 (*del/G*) and rs386693509 (*TG/CA*) polymorphisms, the distribution of genotypes was

assessed for compliance with the Hardy–Weinberg equilibrium – no abnormalities were detected. Taking into account the findings, the multiplicative and general inheritance models were applied to these polymorphisms to identify the post-IVF live birth predictor.

The analysis of the *CSF1R* gene polymorphism alleles and genotypes distribution showed that 53.4% of the examined women carried the *del* allele, while 46.6% carried the *G* allele. The *G* allele and the *del/G* genotype were predominant in the favorable outcome group of women. Therefore, the carriage of the *CSF1R* gene *del/G* rs3216780 genotype acts as a predictor of live birth after induced pregnancy (OR = 11.18, 95% CI = 4.09–30.58, sensitivity: 75%, specificity: 78.8%) (Table 2).

The analysis of the *CSF1R* gene rs386693509 polymorphism distribution showed that 73.3% carried the *TG* allele, while 26.7% carried the *CA* allele. The *TG* allele was predominant in both groups. In Group I, the *TG/CA* was predominant (75%), versus 15.4% in Group II women. Therefore, the carriage of the *CSF1R* gene *TG/CA* rs386693509 genotype acts as a predictor of post-IVF live births (OR = 16.5, 95% CI = 5.68–47.92, sensitivity: 75%, specificity: 84.6%) (Table 2).

Therefore, the univariate analysis has identified the following predictors of the live births at induced pregnancy: 121.3 to 314.8 pg/mL pre-conception CSF-1 in peripheral blood and 963.3 to 1682.8 pg/mL post-ET Day 15 CSF-1, as well as the carriage of the *CSF1R* gene *del/G* rs3216780 and *TG/CA* genotypes. Combinations of these predictors were reported in 66.7% of Group I and 7.7% of Group II women.

Evaluating the IVF procedure's effectiveness implies not only the development of pregnancy but also its live-birth outcome, as about a third of pregnancies end in losses; these are, certainly, determined by multiple factors. Embryo implantation and subsequent placentation depend on the consistent embryo/endometrium interaction regulated by multiple neurohumoral factors. CSF1 is a major regulator of the macrophage-phagocytic system development and homeostasis and, accordingly, a key factor in the control of trophoblastic cells development and homeostasis [1, 12]. Earlier studies in women with tuboperitoneal infertility revealed a relationship between the CSF-1 concentration and the post-IVF pregnancy onset [6]. Literature sources show, however, only not numerous studies that have assessed the association between the CSF-1 system and post-IVF pregnancies resulting in live births.

This is consistent with the findings of other study showing an association between the grown CSF-1 levels and the higher probability of pregnancy [4]. Patients with recurrent miscarriage are also known to have inhibited endometrial CSF-1 production [9]. Hence, the CSF-1 expression can be a potential factor improving the IVF outcomes.

TABLE 1. CSF-1-LEVEL-DEPENDENT NUMBERS OF LIVE BIRTHS IN EXAMINED WOMEN

Factor	Pre-conception CSF-1, pg/mL			
	1 st quartile 121.3-257.5 (n = 22)	2 nd quartile 257.6-314.8 (n = 22)	3 rd quartile 314.9-422.1 (n = 22)	4 th quartile 422.2-725.7 (n = 22)
Live births, n (%)	11 (50%)	16 (72.7%)	5 (22.7%)	4 (18.2%)
Spontaneous miscarriages, n (%)	11 (50%)	6 (27.3%)	17 (77.3%)	18 (81.8%)
Factor	Post-ET Day 15 CSF-1, pg/mL			
	1 st quartile 205.9-691.2 (n = 22)	2 nd quartile 691.3-963.2 (n = 22)	3 rd quartile 963.3-1251.4 (n = 22)	4 th quartile 1251.4-1682.8 (n = 22)
Live births, n (%)	–	2 (9%)	14 (63.6%)	20 (91%)
Spontaneous miscarriages, n (%)	22 (100%)	20 (91%)	8 (36.4%)	2 (9%)

TABLE 2. MULTIPLICATIVE GENERAL MODELS OF INHERITANCE OF CSF1R GENE rs3216780 (*del/G*) AND RS386693509 POLYMORPHISMS

CSF1R gene	Allele/ genotype	Group I (n = 36)	Group II (n = 52)	χ^2	p	OR	
						Value	95% CI
rs3216780 (<i>del/G</i>)	G	0.597	0.375	8.44	0.004	2.47	1.33-4.58
	<i>del</i>	0.403	0.625			0.40	0.22-0.75
	<i>del/del</i>	0.028	0.519	–	< 0.05*	0.03	0.00-0.21
	<i>del/G</i>	0.750	0.212	25.139	< 0.001	11.18	4.09-30.58
	G/G	0.222	0.269	0.251	0.617	0.78	0.29-2.10
rs386693509 (<i>TG/CA</i>)	TG	0.597	0.827	11.47	0.0007	0.31	0.16-0.62
	CA	0.403	0.173			3.22	1.61-6.44
	<i>TG/TG</i>	0.222	0.750	23.81	< 0.001	0.10	0.03-0.26
	<i>TG/CA</i>	0.750	0.154	31.562	< 0.001	16.50	5.68-47.92
	CA/CA	0.028	0.096	–	> 0.05*	0.27	0.03-2.40

Note. *, complies with Fisher's exact test.

The mechanism by which CSF-1 influences the rates of implantation and placentation is not understood so far. It is known, however, that adding CSF-1 to a culture of human trophoblastic cells leads to their differentiation into syncytiotrophoblastic cells and stimulates the production of the placental lactogen. Moreover, adding CSF-1 to a culture of murine blastocystic cells causes the growth of the trophoblast [7]. It is worth noting that in experimental work using osteopetrotic mutant mice that lacked CSF-1, it was shown that the fetus can synthesize its own CSF-1, compensating for its lack in the mother [10].

We believe that the identified predictive value of the CSF-1 system can be due to the *CSF1R* gene polymorphism, which ensures its sensitivity and the implementation of the cytokine's biologic functions. An additional explanation is the longer CSF1R expression on the cell surface at the *del/G* and *TG/CA* variants – this favors the stimulation of trophoblastic

cell growth, angioprotective effect, and faster placental vascularization.

Conclusions

The results of our study allow for the conclusion that CSF-1 plays a major role in the implementation of the female reproductive function. The pre-conception and post-ET Day 15 serum CSF-1 concentrations and the carriage of the *CSF1R* gene *del/G* rs3216780 and *TG/CA* rs386693509 genotypes are of predictive value in the setting of the post-IVF live births. The findings are of interest from the point of view of completing the data on the contributions of both cytokines and gene polymorphisms in the induced pregnancy development. A more accurate assessment requires further research and analysis of the other factors that may have an effect on the expression of the genes involved in the embryo/endometrium interaction and on the live births.

References

1. Ahmad S.F., Duncan W.C., Campbell L.L., Beatty R.E., Koscielniak M., Collins F., Saunders P.T.K., Horne A.W. Targeting colony stimulating factor-1 receptor signalling to treat ectopic pregnancy. *Sci. Rep.*, 2020, Vol. 10, no. 1, 15638. doi: 10.1038/s41598-020-72785-y.
2. Bardos J., Fiorentino D., Longman R.E., Paidas M. Immunological role of the maternal uterine microbiome in pregnancy: pregnancies pathologies and altered microbiota. *Front. Immunol.*, 2020, Vol. 10, 2823. doi: 10.3389/fimmu.2019.02823.
3. Bogdanova I.M., Artemieva K.A., Boltovskaya M.N., Nizyaeva N.V., Kulikov I.A. Functional cytokine redundancy in pregnancy. *Russian Journal of Human Reproduction*, 2024, Vol. 30, no. 6, pp. 73–80. (In Russ.)
4. Camargo-Díaz F., García V., Ocampo-Bárceñas A., González-Marquez H., López-Bayghen E. Colony stimulating factor-1 and leukemia inhibitor factor expression from current-cycle cannula isolated endometrial cells are associated with increased endometrial receptivity and pregnancy. *BMC Womens Health*, 2017, Vol. 17, no. 1, 63. doi: 10.1186/s12905-017-0418-7.
5. Korsak V.S., Smirnova A.A., Shurygina O.V. ART Register of RAHR, 2022. *Russian Journal of Human Reproduction*, 2024, Vol. 30, no. 6, pp. 8–24. (In Russ.)
6. Lapshtaeva A.V., Evsegneeva I.V., Novikov V.V., Karaulov A.V. Serum levels of m-csf and c-fms gene polymorphism as predictors of the effectiveness of *in vitro* fertilization. *Gynecology, Obstetrics and Perinatology*, 2018, Vol. 17, no. 2, pp. 43–47.
7. Massimiani M., Lacconi V., La Civita F., Ticconi C., Rago R., Campagnolo L. Molecular signaling regulating endometrium-blastocyst crosstalk. *Int. J. Mol. Sci.*, 2019, Vol. 21, no. 1, 23. doi: 10.3390/ijms21010023.
8. Muñoz-García J., Cochonneau D., Télétchéa S., Moranton E., Lanoe D., Brion R., Lézot F., Heymann M.F., Heymann D. The twin cytokines interleukin-34 and CSF-1: masterful conductors of macrophage homeostasis. *Theranostics*, 2021, Vol. 11, no. 4, pp. 1568–1593.
9. Othman R., Omar M.H., Shan L.P., Shafiee M.N., Jamal R., Mokhtar N.M. Microarray profiling of secretory-phase endometrium from patients with recurrent miscarriage. *Reprod. Biol.*, 2012, Vol. 12, no. 2, pp. 183–199.
10. Pollard J.W., Hunt J.S., Wiktor-Jedrzejczak W., Stanley E.R. A pregnancy defect in the osteopetrotic (op/op) mouse demonstrates the requirement for CSF-1 in female fertility. *Dev. Biol.*, 1991, Vol. 148, pp. 273–283.
11. Rao V.A., Kurian N.K., Rao K.A. Cytokines, NK cells and regulatory T cell functions in normal pregnancy and reproductive failures. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 2023, Vol. 89, no. 2, e13667. doi: 10.1111/aji.13667.
12. Sehgal A., Irvine K.M., Hume D.A. Functions of macrophage colony-stimulating factor (CSF1) in development, homeostasis, and tissue repair. *Semin. Immunol.*, 2021, Vol. 54, 101509. doi: 10.1016/j.smim.2021.101509.
13. Yadav S., Priya A., Borade D.R., Agrawal-Rajput R. Macrophage subsets and their role: co-relation with colony-stimulating factor-1 receptor and clinical relevance. *Immunol. Res.*, 2023, Vol. 71, no. 2, pp. 130–152.
14. Zhao X., Yan L., Ji S., Zhang Y., Ha L., He C., Tian Y., Chen L., Zhu Q., Li M., Zhang J. Colony-stimulating factor 1 positive (CSF1+) secretory epithelial cells induce excessive trophoblast invasion in tubal pregnancy rupture. *Cell Prolif.*, 2023, Vol. 56, no. 7, e13408. doi: 10.1111/cpr.13408.

Авторы:

Лапштаева А.В. — доцент кафедры иммунологии, микробиологии и вирусологии с курсом клинической иммунологии и аллергологии Медицинского института ФГБОУ ВО «Национальный исследовательский Мордовский государственный университет имени Н.П. Огарева», г. Саранск, Республика Мордовия, Россия

Сычев И.В. — младший научный сотрудник Научно-исследовательского института молекулярной и персонализированной медицины ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Адамчик А.И. — заведующая отделением вспомогательных репродуктивных технологий ГБУЗ Республики Мордовия «Мордовская республиканская центральная клиническая больница», г. Саранск, Республика Мордовия, Россия

Authors:

Lapshtaeva A.V., Associate Professor, Department of Immunology, Microbiology and Virology with Course of Clinical Immunology and Allergology, Medical Institute, National Research Ogarev Mordovia State University, Saransk, Republic of Mordovia, Russian Federation

Sychev I.V., Junior Researcher, Research Institute of Molecular and Personalized Medicine, Russian Medical Academy of Continuous Professional Education, Moscow, Russian Federation

Adamchik A.I., Head, Department of Assisted Reproductive Technologies, Mordovia Republican Central Clinical Hospital, Saransk, Republic of Mordovia, Russian Federation

Поступила 30.03.2025
Принята к печати 25.05.2025

Received 30.03.2025
Accepted 25.05.2025

ВЛИЯНИЕ КИССПЕПТИНА НА ФАГОЦИТАРНУЮ АКТИВНОСТЬ МОНОЦИТОВ И НЕЙТРОФИЛОВ, АПОПТОЗ МОНОНУКЛЕАРНЫХ КЛЕТОК ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ В КОНТЕКСТЕ ФИЗИОЛОГИЧЕСКОЙ БЕРЕМЕННОСТИ

Горбунова О.Л., Ширшев С.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. Известно, что во время беременности происходит перестройка иммунной системы матери, связанная с формированием специфической иммунной толерантности, направленной на сохранение плода от неблагоприятных иммунных реакций матери и в то же время на защиту матери и плода от патогенов. Супрессия адаптивного иммунного ответа матери компенсируется повышением роли естественного иммунитета, основными эффекторами которого являются нейтрофилы и моноциты/макрофаги. Апоптоз играет важную роль в период беременности, поскольку активированные клетки могут быть опасны для развивающегося плода. Гормоны беременности играют основную роль в этой перестройке. Гипоталамический гормон кисспептин-54 продуцируется синцитиотрофобластом плаценты и может оказывать эффекты на лейкоциты беременной женщины, поскольку они экспрессируют специфический мембранный рецептор кисспептина. Цель работы — оценка влияния кисспептина-54 в концентрациях, характерных для физиологической беременности, на фагоцитарную активность моноцитов и нейтрофилов, а также апоптоз мононуклеарных клеток периферической крови (МПК) женщин. Объект исследования: МПК, сепарированные моноциты и нейтрофилы, полученные от 10 здоровых небеременных женщин репродуктивного возраста. Фагоцитарную активность оценивали по степени гашения биolumинесценции люминесцентного генно-инженерного штамма *E. coli* K12 TG1 lux⁺. Апоптоз лимфоцитов оценивали в суспензии МПК путем окрашивания аннексином-V и йодистым пропидием. Определяли количество клеток на ранней и поздней стадиях апоптоза в гейте лимфоцитов. Направленность эффектов кисспептина-54 на фагоцитоз зависит от типа клеток. Гормон угнетает фагоцитоз нейтрофилов, чей повышенный фагоцитарный потенциал может иметь фатальные последствия для развития плода. Прямо противоположный эффект кисспептин-54 оказывает на фагоцитоз моноцитов, которые являются основными эффекторно-регуляторными клетками маточно-плацентарного компартмента, выполняющие фетотрофические функции. Кисспептин-54 увеличивает количество клеток, находящихся в ранней и поздней стадиях апоптоза. Снижение фагоцитарной активности нейтрофилов связано с гормон-обусловленным апоптозом

Адрес для переписки:

Горбунова Ольга Леонидовна
Институт экологии и генетики микроорганизмов
Уральского отделения Российской академии наук
614081, Россия, г. Пермь, ул. Голева, 13.
Тел.: 8 (342) 280-84-31.
E-mail: olia15_77@mail.ru

Address for correspondence:

Olga L. Gorbunova
Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms
13 Golev St
Perm
614081 Russian Federation
Phone: +7 (342) 280-84-31.
E-mail: olia15_77@mail.ru

Образец цитирования:

О.Л. Горбунова, С.В. Ширшев «Влияние кисспептина на фагоцитарную активность моноцитов и нейтрофилов, апоптоз мононуклеарных клеток периферической крови в контексте физиологической беременности» // Российский иммунологический журнал, 2025. Т. 28, № 3. С. 591–596.
doi: 10.46235/1028-7221-17112-EOK
© Горбунова О.Л., Ширшев С.В., 2025
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

O.L. Gorbunova, S.V. Shirshv “Effect of kisspeptin on mononuclear cell apoptosis, phagocytic activity of monocytes and neutrophils in pregnancy”, Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2025, Vol. 28, no. 3, pp. 591–596.
doi: 10.46235/1028-7221-17112-EOK
© Gorbunova O.L., Shirshv S.V., 2025
The article can be used under the Creative Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.46235/1028-7221-17112-EOK

нейтрофилов, поскольку нейтрофилы терминально дифференцированные клетки, запрограммированные на апоптоз. По видимому, кисспептин-54 является фактором, который индуцирует апоптоз нейтрофилов в период беременности, что определяет снижение их фагоцитарной функции и предупреждает чрезмерную активацию, способную причинить вред матери и плоду. Таким образом, кисспептин-54 разнонаправленно регулирует функциональную активность моноцитов и нейтрофилов, обеспечивая баланс между защитой организма матери от инфекций и благоприятным развитием полуаллогенного плода.

Ключевые слова: кисспептин-54, нейтрофилы, моноциты, беременность, апоптоз, фагоцитоз

EFFECT OF KISSPEPTIN ON MONONUCLEAR CELL APOPTOSIS, PHAGOCYTIC ACTIVITY OF MONOCYTES AND NEUTROPHILS IN PREGNANCY

Gorbunova O.L., Shirshev S.V.

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

Abstract. During pregnancy, the maternal immune system undergoes a rearrangement associated with development of immune tolerance which preserves the fetus from adverse maternal immune responses and exerts their protection from pathogens. Suppression of maternal adaptive immune response is balanced by an increased influence of natural immunity, with neutrophils and monocytes being the main effector populations. Apoptosis also plays an important role during pregnancy, since activated cells may be dangerous to the developing fetus. Pregnancy hormones play a major role in this restructuring. The hypothalamic hormone kisspeptin-54 is produced by placental syncytiotrophoblast and may exert effects on pregnant women's leukocytes, since they express a membrane kisspeptin receptor. The aim of our work was to evaluate the effect of kisspeptin-54 at the concentrations typical for physiological pregnancy on the phagocytic activity of monocytes, neutrophils, and apoptosis of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) in women. Phagocytic activity was assessed by the degree of bioluminescence quenching of the genetically engineered luminescent *E. coli* K12 TG1 lux⁺ strain. Lymphocyte apoptosis was assessed in the PBMC suspension by staining with annexin-V and propidium iodide. The number of cells at the early and late stages of apoptosis in the lymphocyte gate was determined. The direction of kisspeptin-54 effects on phagocytosis depends on the cell type. This hormone inhibits phagocytosis of neutrophils. Meanwhile, their increased phagocytic potential may have fatal consequences for fetal development. Kisspeptin-54 exhibited a directly opposite effect on the phagocytosis of monocytes which are the main effectors/regulatory cells in the utero-placental compartment performing fetotrophic functions. Kisspeptin-54 increases the number of cells in the early and late stages of apoptosis. The decrease in phagocytic activity of neutrophils is associated with hormone-mediated apoptosis of neutrophils, since neutrophils are terminally differentiated cells programmed for apoptosis. Kisspeptin-54 seems to induce neutrophil apoptosis during pregnancy thus determining a decrease in their phagocytic function and preventing excessive activation that may be harmful to the mother and fetus. Thus, kisspeptin-54 regulates the functional activity of monocytes and neutrophils in different directions, ensuring a balance between protecting the maternal organism from infections and favorable development of the semi-allogeneic fetus.

Keywords: kisspeptin-54, neutrophils, monocytes, pregnancy, apoptosis, phagocytosis

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

Введение

Беременность представляет собой феномен естественной полуаллогенной трансплантации, поскольку плод наполовину чужероден в силу экспрессии отцовских антигенов [1]. При беременности происходит перестройка иммунной системы матери, связанная с формированием специфической иммунной толерантности, на-

правленной на сохранение плода от неблагоприятных иммунных реакций матери и защиту матери и плода от патогенов [1]. Супрессия адаптивного иммунного ответа матери компенсируется повышением естественного иммунитета, основными эффекторами которого являются нейтрофилы и моноциты/макрофаги [3, 4]. Увеличивается количество лейкоцитов за счет нейтрофилов и моноцитов/макрофагов, изменяется функциональная активность данных клеток [3, 4]. Моноциты и макрофаги в плацентарном ложе осуществляют клиренсную функцию [1], являются основным источником цитокинов, способствующих Th2

доминированию и определяют вид иммунного реагирования [4]. Нейтрофилы характеризуются снижением фагоцитарной, бактерицидной активности, установлена прямая связь между выраженностью этого угнетения и течением беременности [5]. В период беременности важная роль отводится апоптозу — запрограммированной клеточной гибели. Помимо элиминации поврежденных, мутантных клеток, посредством апоптоза реализуются процессы дифференцировки и морфогенеза при формировании тканей и органов, осуществляется поддержание клеточного гомеостаза организма и защита от патогенов [6].

Важную роль в этой перестройке играют гормоны беременности, оказывающие регулирующее влияние на клетки иммунной системы матери [7]. Кисспептины образуют семейство пептидов, продуцируются нейронами гипоталамуса и стимулируют секрецию гонадотропин-рилизинг-гормона [8], играя важную роль в репродукции человека, практически не попадая в системный кровоток [8]. Во время беременности кисспептины продуцируются синцитиотрофобластом плаценты [8] и могут оказывать системные эффекты на лейкоциты женщины, в силу экспрессии специфического рецептора кисспептина (KISS-1R), относящегося к классу G_{aq} ассоциированных рецепторов [9]. Основной формой циркулирующего гормона является кисспептин-54 [9]. Концентрации кисспептина-54 в крови составляют: 1,3 пМ в первом, 4,6 пМ во втором и 9,6 пМ в третьем триместрах беременности [8]. Уровень кисспептина-54 в крови является маркером успешной беременности.

Ранее нами установлено, что кисспептин-54 является физиологическим регулятором системной девиации основных эффекторных и регуляторных субпопуляций Т-клеток (Th17, Treg). Мы показали, что на уровне клеток адаптивного иммунитета кисспептин-54 способствует формированию иммунной толерантности к антигенам плода, что в конечном итоге определяет успешность гестационного процесса [10]. Однако данные об иммуномодулирующем действии кисспептина-54 на функциональную активность клеток неспецифической резистентности отсутствуют. **Цель работы** — оценка влияния кисспептина-54 в концентрациях, характерных для физиологической беременности, на фагоцитарную активность моноцитов и нейтрофилов, а также апоптоз мононуклеарных клеток периферической крови женщин.

Материалы и методы

Кисспептин (Кисспептин-54, Metastin, CAL-BIOСHEM, США) использовали в физиологических концентрациях, соответствующих его уровню в периферической крови в I, II и III триместрах беременности (1,3 пМ, 4,6 пМ и 9,6 пМ) [8]. Объект исследования: мононуклеарные клетки перифе-

рической крови (МПК), сепарированные моноциты и нейтрофилы, от 10 здоровых небеременных женщин репродуктивного возраста (от 23 до 32 лет). Венозную кровь забирали в фолликулярную фазу менструального цикла (5–11-й день), так как экспрессия KiSS-1R максимум в этот период [8]. Исследование проводилось согласно Хельсинкской декларации, получено одобрение комитета по этике ИЭГМ УрО РАН. Критериями включения явились добровольное информированное согласие и отсутствие приема гормональных препаратов.

МПК и нейтрофилы периферической крови получали центрифугированием на двойном градиенте плотности Фиколл—Урографина (Bayer Schering Pharma AG, Германия). Плотности верхнего и нижнего градиентов составили 1,077 и 1,112 г/см³, соответственно. МПК собирали из верхней интерфазы, а нейтрофилы из нижней. Для выделения моноцитов суспензию МПК помещали в пластиковые чашки Петри с 5%-ной фетальной бычьей сывороткой (FBS) (Sigma, США) и инкубировали 45 минут при 37 °С и 5% CO₂. Адгезированные моноциты снимали, промывали RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, США), и для стабилизации моноциты инкубировали 45 минут при 4 °С и 5% CO₂ [11]. Чистота выделения моноцитов, оцениваемая с использованием моноклональных антител к CD14 (Primary Anti-Human CD14, ICN Ph., США), составляла 78–85%. Жизнеспособность клеток, определяемая по включению витального красителя эозина (0,01%) (Sigma, США), составляла 93–98%. Культивирование выделенных МПК, моноцитов и нейтрофилов (10⁶ кл/мл) с гормоном осуществлялось в полной питательной среде (ППС): RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, США), 10% FBS (Sigma, США), 10 мМ Hepes (ICN Pharmaceuticals, США), 2 мМ L-глутамин (ICN Pharmaceuticals, США) и 100 мкг/мл гентамицин (KRKA, Словения) 1 час при 37 °С. В контрольные пробы вносили растворитель гормона (0,9% NaCl).

Определение фагоцитарной активности нейтрофилов/моноцитов оценивали по описанной ранее методике [12]. Бактерии люминесцентного генно-инженерного штамма *E. coli* K12 TG1 lux⁺, несущих lux-оперон морской люминесцентной бактерии *V. fischeri* обладают способностью к биолюминесценции, которая гасится в процессе поглощения их фагоцитами. Моноциты/нейтрофилы, предварительно проинкубированные с гормоном, центрифугировали, удаляли супернатанты, доводили до нужного объема раствором Хенкса. Лيوфилизированную *E. coli* K12 TG1 lux⁺ регидротировали в 0,89% NaCl. Затем моноциты/нейтрофилы (160 мкл, 10⁶ кл/мл) смешивали с 40 мкл реакционной смеси (20 мкл *E. coli* K12 TG1 lux⁺ 10⁸ клетка/мл, 20 мкл пула сыворотки для опсонизации) в белых 96-луночных планшетах. Биолюминесценцию бактериально-фагоцитар-

ной смеси оценивали при 37 °С в течение 30 мин с помощью микропланшетного фотометра (Synergy H1, BioTek, США) с 5-мин интервалом. Рассчитывали индекс фагоцитарной активности (ИФА), отражающий процент тушения биолюминесценции по сравнению с исходным уровнем: $ИФА = ((X_1 - X_2)/X_1) \times 100$, где X_1 — интенсивность биолюминесценции исходного уровня свечения, X_2 — интенсивность биолюминесценции проб (бактерии + нейтрофилы/моноциты).

Апоптоз лимфоцитов оценивали в суспензии МПК путем окрашивания аннексином-V (AnV-FITC, Caltag, США) и йодистым пропидием (PI, eBioscience, США). Определяли клетки находящиеся в ранней (AnV^+/PI^-) и поздней стадиях (AnV^+/PI^+) апоптоза [13]. Индуктором апоптоза служил дексаметазон (10^{-6} М, KRKA, Словения), который вносили в культуры за 30 мин до гормона. Контролем служили пробы с дексаметазоном. Клетки инкубировали 24 ч в ППС, при 37 °С и 5% CO_2 . Результаты учитывали на проточном цитофлуориметре FACSCalibur (Becton Dickinson, США). Определение количества клеток на ранней и поздней стадиях апоптоза проводили в выделенном гейте лимфоцитов.

Полученные данные обрабатывали при помощи вариационной статистики. Вычисляли среднее арифметическое и ошибку среднего ($M \pm m$). Нормальность распределения данных контроли-

ровалась критерием Фишера. Учитывая, что во всех тестах распределение было нормальным, достоверность различий между средними величинами оценивали парным t-критерием Стьюдента. Различия считались значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Часовая инкубация обогащенной моноцитами клеточной суспензии с кисспептином-54 в концентрации, соответствующей III триместру беременности (9,6 pM), достоверно стимулирует процесс поглощения опсонизированных *E. coli* K12 TG1 lux⁺ на протяжении всего времени регистрации фагоцитоза. В других концентрациях гормон не оказывал статистически значимого действия (табл. 1). Инкубация нейтрофилов с гормоном показала, что кисспептин-54 в концентрации, соответствующей I триместру беременности, снижает фагоцитарную активность нейтрофилов в динамике всего исследования, а в концентрациях, соответствующих II и III триместру, только с 20 мин исследования (табл. 1).

Гормон, вне зависимости от концентрации, приводит к достоверному увеличению МПК, находящихся в поздней стадии апоптоза. В концентрациях, характерных для II и III триместров беременности, кисспептин увеличивает процент клеток, находящихся в стадии раннего апопто-

ТАБЛИЦА 1. ВЛИЯНИЕ КИСПЕПТИНА-54 НА ФАГОЦИТАРНУЮ АКТИВНОСТЬ МОНОЦИТОВ И НЕЙТРОФИЛОВ

TABLE 1. EFFECT OF KISSPEPTIN-54 ON THE PHAGOCYTIC ACTIVITY OF MONOCYTES AND NEUTROPHILS

Эксперимент. воздействие Experimental impact (n = 10)	Фагоцитарный индекс, % / Phagocytic index, %					
	0 мин 0 min	10 мин 10 min	15 мин 15 min	20 мин 20 min	25 мин 25 min	30 мин 30 min
Моноциты / Monocytes						
Контроль Control	19,5±3,8	21,8±5,1	33,1±2,7	43,5±1,1	45,5±1,9	53,9±2,3
Кисспептин-54, 1,3 pM Kisspeptin-54, 1.3 pM	21,4±4,1	20,9±3,6	34,4±1,4	43,2±1,9	45,6±2,8	53,8±2,5
Кисспептин-54, 4,6 pM Kisspeptin-54, 4.6 pM	19,6±2,1	18,7±6,7	32,9±2,3	42,2±1,7	44,3±2,4	53,0±1,7
Кисспептин-54, 9,6 pM Kisspeptin-54, 9.6 pM	22,3±3,8 $p < 0,05$	24,1±4,1 $p < 0,05$	38,4±1,6 $p < 0,05$	48,0±1,9 $p < 0,05$	51,4±1,6 $p < 0,05$	59,9±1,5 $p < 0,05$
Нейтрофилы / Neutrophils						
Контроль Control	38,3±1,3	47,3±1,2	58,1±1,8	62,0±1,2	78,7±1,8	80,1±2,0
Кисспептин-54, 1,3 pM Kisspeptin-54, 1.3 pM	32,6±1,8 $p < 0,05$	38,6±1,6 $p < 0,05$	43,5±2,7 $p < 0,05$	41,6±2,3 $p < 0,05$	51,5±3,2 $p < 0,05$	52,8±1,6 $p < 0,05$
Кисспептин-54, 4,6 pM Kisspeptin-54, 4.6 pM	39,6±2,0	49,6±2,2	56,2±0,7	55,9±1,8 $p < 0,05$	66,7±1,7 $p < 0,05$	65,4±1,9 $p < 0,05$
Кисспептин-54, 9,6 pM Kisspeptin-54, 9.6 pM	40,7±1,0	50,7±3,2	57,0±0,7	56,3±1,9 $p < 0,05$	66,3±1,4 $p < 0,05$	66,4±2,2 $p < 0,05$

Примечание. p – достоверность отличий от контроля, $p < 0,05$.

Note. p, significance of differences from control, $p < 0.05$

ТАБЛИЦА 2. ВЛИЯНИЕ КИСПЕПТИНА-54 НА АПОПТОЗ МПК

TABLE 2. EFFECT OF KISSPEPTIN-54 ON PBMC APOPTOSIS

Экспериментальное воздействие Experimental impact (n = 10)	Апоптоз, % / Apoptosis, %	
	An*Pr	An*Pr*
Контроль / Control	10,60±0,82	15,69±0,96
Кисспептин-54, 1,3 pM Kisspeptin-54, 1.3 pM	12,65±0,50 p < 0,05	18,12±0,18 p < 0,05
Кисспептин-54, 4,6 pM Kisspeptin-54, 4.6 pM	17,88±1,23 p < 0,05	17,20±0,56 p < 0,05
Кисспептин-54, 9,6 pM Kisspeptin-54, 9.6 pM	15,48±0,84 p < 0,05	19,71±0,99 p < 0,05

Примечание. p – достоверность отличий от контроля, p < 0,05.

Note. p, significance of differences from control, p < 0.05

за (табл. 2). По-видимому, малая концентрация (1,3 pM), обладая менее выраженным действием, не успевает фиксироваться в данной постановке эксперимента.

Полученные результаты показывают, что кисспептин-54 в концентрациях характерных для нормальной беременности принимает непосредственное участие в регулировании фагоцитарной активности нейтрофилов/моноцитов периферической крови. Важно отметить, что направленность действия гормона зависит от типа фагоцитирующих клеток. Так, на фагоцитарную активность моноцитов, являющихся основными эффекторно-регуляторными клетками маточно-плацентарного компартмента, реализующих защитные и фетотрофические функции, кисспептин-54 оказывает стимулирующее действие. Напротив, нейтрофилы, чей повышенный фагоцитарный потенциал в период беременности может иметь фатальные последствия для развития плода [4], угнетаются под воздействием кисспептина-54.

И моноциты, и нейтрофилы экспрессируют KISS-1R. При связывании KISS-1R на поверхности клеток с гормоном активируется фосфолипаза C, образуются вторичные посредники, повышающие внутриклеточный Ca^{2+} [9], уровень которого и определяет активацию процессов поглощения опсонизированных бактерий [2]. Снижение фагоцитарной активности нейтрофилов или полное отсутствие эффекта кисспептина-54 можно объяснить гормон-обусловленным апоптозом нейтрофилов. Нейтрофилы – это терминально дифференцированные, короткоживущие клетки, запрограммированные на апоптоз, и, по-видимому, связывание кисспептина-54 на поверхности нейтрофилов с KISS-1R приводит в первую очередь к активации каспаз, которые контролируются мессенджерами этого же фосфоинозитидного обмена через фосфорилирование MEK1/2 и ERK1/2 протеинкиназ [14].

Учитывая, что инкубация кисспептина-54 с нейтрофилами составляла только 1 час, можно

допустить, что снижение фагоцитарной активности нейтрофилов связано с проапоптотическим действием гормона. Исследования Stathaki с соавторами также показывают, что кисспептин-54 индуцирует апоптоз лимфоцитов *in vitro* [15]. Известно, что проапоптотический фенотип нейтрофилов необходим для нормальной плацентации и развития беременности [2]. Кроме этого обнаружена способность неактивированных (проапоптотических) нейтрофилов принимать участие в формировании иммунологической толерантности при беременности путем индукции Treg [2]. Таким образом, во время беременности кисспептин-54 повышает апоптоз МПК, что лежит в основе снижения фагоцитарной активности нейтрофилов и одновременно усиливает фагоцитоз моноцитов. Не исключено, что во время физиологической беременности изменения функциональной активности нейтрофилов и моноцитов определяются плацентарным синтезом гормона.

Выводы

Направленность действия кисспептина-54 на фагоцитарную активность зависит от типа фагоцитирующих клеток экспрессирующих KISS-1R. Так, гормон индуцирует апоптоз нейтрофилов, что определяет снижение фагоцитарной функции и предупреждает чрезмерную активацию данных клеток, способную причинить вред плоду и организму матери. На уровне моноцитов, являющихся основными эффекторно-регуляторными клетками маточно-плацентарного компартмента, реализующих фетотрофические функции, гормон оказывает стимулирующее действие. Таким образом, кисспептин-54 является новым, ранее не учитываемым фактором регуляции фагоцитарной активности моноцитов и нейтрофилов во время беременности, который способствует поддержанию баланса между защитой организма матери от инфекции и благоприятным развитием полуаллогенного плода.

Список литературы / References

1. Дёрфлинг П., Вихнер З. Выделение макрофагов из суспензии спленоцитов. В: Фримель Г. (ред.). Иммунологические методы. Пер. с нем. А.П. Тарасова. М.: Медицина, 1987. С. 373-378. [Derfling P., Wichner Z. Isolation of macrophages from splenocyte suspension. In: Frimel G. (ed.). Immunological methods. Transl. from German by A.P. Tarasova]. Moscow: Meditsina, 1987, pp. 373-378.
2. Сибиряк С.В. Оценка апоптоза в иммунологических исследованиях. Екатеринбург: УрО РАН, 2008. 59 с. [Sibiryak S.V. Assessment of apoptosis in immunological studies]. Yekaterinburg: Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, 2008. 59 p.
3. Ширшев С.В., Куклина Е.М., Заморина С.А., Никитина Н.М., Некрасова И.В. Способ определения фагоцитарной активности лейкоцитов по степени угасания биолюминесценции // Иммунология, 2014. Т. 35, № 6. С. 312-317. [Shirshov S.V., Kuklina E.M., Zamorina S.A., Nikitina N.M., Nekrasova I.V. The method for determination of leukocytes phagocytic activity by bioluminescence extinction degree. *Immunologiya = Immunologiya*, 2014, Vol. 35, no. 6, pp. 312-317. (In Russ.)]
4. Alexander H., Zimmerman G., Lehmann M., Pfeiffer R., Schone E., Leiblein S., Ziegert M. HCG secretion by peripheral mononuclear cells during pregnancy. *Domest. Anim. Endocrinol.*, 1998, Vol. 15, no. 5, pp. 377-387.
5. Chu J.Y., Dransfield C., Rossi A.G., Vermeren S. Non-canonical PI3K-Cdc42-Pak-Mek-Erk signaling promotes immune-complex-induced apoptosis in human neutrophils. *Cell Rep.*, 2016, Vol. 17, no. 2, pp. 374-386.
6. Dale D.C., Boxer L., Liles W.C. The phagocytes: neutrophils and monocytes. *Blood*, 2008, Vol. 112, no. 4, pp. 935-945.
7. Gorbunova O.L., Shirshov S.V. Molecular mechanisms of the regulation by kisspeptin of the formation and functional activity of TREG and TH17. *Biochem. Moscow Suppl. Ser. A*, 2016, Vol. 10, pp. 180-187.
8. Horikoshi Y., Matsumoto H., Takatsu Y., Ohtaki T., Kitada C., Usuki S., Fujino M. Dramatic elevation of plasma metastatin concentrations in human pregnancy: metastatin as a novel placenta derived hormone in humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2003, Vol. 2, pp. 914-919.
9. Knobloch V., Plundrova D. Phagocytosis in pregnancy. *Cesk. Gynecol.*, 1991, Vol. 56, no. 9-10, pp. 473-476.
10. Mor G., Abrahams V.M. Potential role of macrophages as immunoregulators of pregnancy. *Reprod. Biol. Endocrinol.*, 2003, Vol. 1, 119. doi: 10.1186/1477-7827-1-119.
11. Muir A.I., Chamberlain L., Elshourbagy N.A., Michalovich D., Moore D.J., Calamari A., Szekeres P.G., Sarau H.M., Chambers J.K., Murdock P., Steplewski K., Shabon U., Miller J.E., Middleton S.E., Darker J.G., Larminie C.G., Wilson S., Bergsma D.J., Emson P., Faull R., Philpott K.L., Harrison D.C. AXOR12, a novel human G protein-coupled receptor, activated by the peptide KiSS-1. *J. Biol. Chem.*, 2001, Vol. 276, pp. 28969-28975.
12. Napso T., Yong H.E.J., Lopez-Tello J., Sferruzzi-Perri A.N. The role of placental hormones in mediating maternal adaptations to support pregnancy and lactation. *Front. Physiol.*, 2018, Vol. 9, 1091. doi: 10.3389/fphys.2018.01091.
13. Rendell V., Bath N.M., Brennan T.V. Medawar's paradox and immune mechanisms of fetomaternal tolerance. *OBM Transplant.*, 2020, Vol. 4, no. 1, 26. doi: 10.21926/obm.transplant.2001104.
14. Stathaki M., Armakolas A., Dimakakos A., Kaklamanis L., Vlachos I. Kisspeptin effect on endothelial monocyte activating polypeptide II (EMAP-II)-associated lymphocyte cell death and metastases in colorectal cancer patients. *Mol. Med.*, 2014, Vol. 20, no. 1, pp. 80-92.
15. Walsh C.M., Edinger A.L. The complex interplay between autophagy, apoptosis, and necrotic signals promotes T-cell homeostasis. *Immunol. Rev.*, 2010, Vol. 236, pp. 95-109.

Авторы:

Горбунова О.Л. — к.б.н., 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

Ширшев С.В. — д.м.н., заведующий лабораторией 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

Authors:

Gorbunova O.L., PhD (Biology), Researcher, Laboratory of Immunoregulation, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Perm Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation

Shirshov S.V., PhD, MD (Medicine), Head, Laboratory of Immunoregulation, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Perm Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation

Поступила 10.03.2025

Отправлена на доработку 12.03.2025

Принята к печати 25.05.2025

Received 10.03.2025

Revision received 12.03.2025

Accepted 25.05.2025

АКТИВНОСТЬ ЯДЕРНОГО ФАКТОРА ТРАНСКРИПЦИИ NF-κB В ПОПУЛЯЦИЯХ ЛИМФОЦИТОВ У ДЕТЕЙ С БОЛЕЗНЬЮ ГОШЕ

Коняшин М.В.¹, Курбатова О.В.¹, Петричук С.В.¹, Мовсисян Г.Б.¹,
Фрейдлин Е.В.¹, Купцова Д.Г.¹, Радыгина Т.В.¹, Семикина Е.Л.^{1,2},
Потапов А.С.^{1,2}, Фисенко А.П.¹

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

² ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова»
Министерства здравоохранения РФ (Сеченовский университет), Москва, Россия

Резюме. Исследование посвящено изучению роли транскрипционного фактора NF-κB в патогенезе хронического воспаления при болезни Гоше у детей. Болезнь Гоше — орфанное аутосомно-рецессивное лизосомное заболевание, характеризующееся мутациями в гене β-глюкоцереброзидазы, приводящими к снижению активности данного фермента и, как следствие, к накоплению субстрата — глюкоцерамида. Макрофаги, трансформированные в клетки Гоше, из-за аккумуляции глюкоцерамида, секретируют провоспалительные цитокины (IL-1β, IL-6, TNFα), запуская хроническое воспаление во внутренних органах через активацию ядерного фактора транскрипции NF-κB по каноническому пути. Цель работы — оценка доли клеток с активностью ядерного фактора транскрипции NF-κB в популяциях лимфоцитов у детей с болезнью Гоше. Оценивали долю клеток с транслокацией NF-κB в популяциях лимфоцитов периферической крови у 70 пациентов с болезнью Гоше (58 — 1-й тип, 12 — 3-й тип), получающих ферментозаместительную терапию и у 30 условно здоровых детей. По результатам исследований выявлено значимое увеличение доли клеток с транслокацией NF-κB в Т-лимфоцитах, Т-хелперах, цитотоксических Т-клетках, НК-клетках, В-лимфоцитах, а также в Т-хелперах 17-го типа, активированных Т-хелперах и в регуляторных Т-клетках у пациентов с болезнью Гоше относительно группы сравнения ($p < 0,001$). У детей с БГ наибольшее количество клеток с транслокацией NF-κB выявлено в популяциях В-лимфоцитов и НК-клеток. В ходе исследования пациентов с различными типами БГ было установлено, что у детей с 1-м типом БГ во всех изученных популяциях лимфоцитов наблюдалось достоверное повышение уровня транслокации NF-κB, у больных с 3-м типом БГ также отмечалось значимое увеличение транслокации NF-κB в Т-лимфоцитах, Т-хелперах,

Адрес для переписки:

Коняшин Матвей Валерьевич
ФГАУ «Национальный медицинский
исследовательский центр здоровья детей»
Министерства здравоохранения РФ
119991, Россия, Москва, Ломоносовский пр., 2, стр. 1.
Тел.: 8 (985) 141-53-20.
E-mail: matele99@mail.ru

Address for correspondence:

Matvey V. Konyashin
National Medical Research Center for Children's Health
2 Lomonosovsky Ave, Bldg 1
Moscow
119991 Russian Federation
Phone: +7 (985) 141-53-20.
E-mail: matele99@mail.ru

Образец цитирования:

М.В. Коняшин, О.В. Курбатова, С.В. Петричук,
Г.Б. Мовсисян, Е.В. Фрейдлин, Д.Г. Купцова,
Т.В. Радыгина, Е.Л. Семикина, А.С. Потапов,
А.П. Фисенко «Активность ядерного фактора
транскрипции NF-κB в популяциях лимфоцитов
у детей с болезнью Гоше» // Российский
иммунологический журнал, 2025. Т. 28, № 3.
С. 597-604.
doi: 10.46235/1028-7221-17203-AOT

© Коняшин М.В. и соавт., 2025
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

M.V. Konyashin, O.V. Kurbatova, S.V. Petrichuk,
G.B. Movsisyan, E.V. Freidlin, D.G. Kuptsova, T.V. Radygina,
E.L. Semikina, A.S. Potapov, A.P. Fisenko "Activity of the
nuclear transcription factor NF-κB in lymphocyte
populations in children with Gaucher disease", Russian Journal
of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2025,
Vol. 28, no. 3, pp. 597-604.
doi: 10.46235/1028-7221-17203-AOT

© Konyashin M.V. et al., 2025
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.46235/1028-7221-17203-AOT

цитотоксических Т-лимфоцитах, НК-клетках, Th17-клетках, активированных Т-хелперах и регуляторных Т-клетках относительно группы сравнения. Однако в популяциях В-лимфоцитов и двойных негативных Т-лимфоцитов у больных с 3-м типом БГ относительно группы сравнения статистически значимых различий выявлено не было. Результаты исследования подтверждают ключевую роль NF-κB в поддержании хронического воспаления при болезни Гоше. Современный метод проточной цитометрии с визуализацией позволяет с высокой точностью определять активность NF-κB в разных популяциях лимфоцитов периферической крови, включая Th17 и Treg. Целесообразно проводить дополнительные исследования по влиянию инициации ферментозаместительной терапии на показатели активности NF-κB в популяциях лимфоцитов у детей с болезнью Гоше.

Ключевые слова: дети, болезнь Гоше, лимфоциты, фактор транскрипции NF-κB, проточная цитометрия с визуализацией, ферментозаместительная терапия

ACTIVITY OF THE NUCLEAR TRANSCRIPTION FACTOR NF-κB IN LYMPHOCYTE POPULATIONS IN CHILDREN WITH GAUCHER DISEASE

Konyashin M.V.^a, Kurbatova O.V.^a, Petrichuk S.V.^a, Movsisyan G.B.^a, Freidlin E.V.^a, Kuptsova D.G.^a, Radygina T.V.^a, Semikina E.L.^{a,b}, Potapov A.S.^{a,b}, Fisenko A.P.^a

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

^b Sechenov First Moscow State Medical University, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Abstract. The study is devoted to the role of the transcription factor NF-κB in pathogenesis of chronic inflammation in Gaucher disease (GD) in children. Gaucher disease is an orphan autosomal recessive lysosomal disorder characterized by mutations in the β-glucocerebrosidase gene, leading to a decrease in the activity of this enzyme and, as a consequence, to the accumulation of the substrate – glucoceramide. Macrophages transformed to Gaucher cells, due to the accumulation of glucoceramide, secrete proinflammatory cytokines (IL-1β, IL-6, TNFα), triggering chronic inflammation in internal organs *via* activation of NF-κB nuclear transcription factor along the canonical pathway. The aim of the work was to assess the proportion of cells with the activity of the nuclear transcription factor NF-κB in lymphocyte populations in children with GD. The ratio of cells with NF-κB translocation in peripheral blood lymphocyte populations was assessed in 70 GD patients (type 1, 58 cases; type 3, 12 patients) receiving enzyme replacement therapy, and in 30 conditionally healthy children. The results of the studies revealed a significantly increased proportion of cells with NF-κB translocation in T lymphocytes, T helpers, cytotoxic T cells, NK cells, B lymphocytes, as well as in T helpers type 17, activated T helpers and in regulatory T cells in GD patients compared with control group ($p < 0.001$). In children with GD, the highest number of cells with NF-κB translocation was found in B lymphocytes and NK cell populations. In the course of the study of patients with different types of GD, it was found that in children with type 1 GD, a significant increase in the level of NF-κB translocation was observed in all studied lymphocyte populations. In patients with type 3 GD, a significant increase in NF-κB translocation in T lymphocytes, T helpers, cytotoxic T lymphocytes, NK cells, Th17 cells, activated T helpers and regulatory T cells was also noted, relative to the comparison group. However, in the populations of B lymphocytes and double negative T lymphocytes in patients with type 3 GD, no statistically significant differences were found against the comparison group. The results of the study confirm the key role of NF-κB in maintaining chronic inflammation in Gaucher disease. Modern flow cytometry approach with visualization allows to determine NF-κB activity in different populations of peripheral blood lymphocytes, including Th17 and Treg, with high accuracy. It is advisable to conduct additional studies concerning the effect of initiated enzyme replacement therapy on NF-κB activity in lymphocyte populations of children with Gaucher disease.

Keywords: children, Gaucher disease, lymphocytes, transcription factor NF-κB, flow cytometry with visualization, enzyme replacement therapy

Введение

Болезнь Гоше (БГ) — орфанное (OMIM #230800, ORPHA355) аутосомно-рецессивное лизосомное заболевание, характеризующееся мутациями в гене β-глюкоцереброзидазы (ГЦБ), приводящими к снижению активности данного фермента и, как следствие, к накоплению субстрата — глюкоцерамида [12, 14]. Частота встречаемости заболевания в популяции варьирует от 1:40 000 до 1:60 000. БГ классифицируется на три типа. При всех типах болезни Гоше наблюдается аккумуляция глюкоцерамида, что приводит к перегрузке ретикулоэндотелиальной системы, развитию гепатоспленомегалии, хроническому воспалению во внутренних органах, поражению костного мозга, костным деформациям и неврологическим нарушениям (при нейронопатических формах БГ) [9]. 1-й тип (наиболее распространенный) характеризуется отсутствием поражения центральной нервной системы (ЦНС). 2-й тип проявляется тяжелым поражением ЦНС, дебютирующим в раннем возрасте, и характеризуется ранней смертностью. 3-й тип отличается медленно прогрессирующим поражением ЦНС с постепенным нарастанием неврологической симптоматики [6].

Одним из ключевых регуляторов воспалительного процесса является транскрипционный фактор NF-κB, активация NF-κB и транслокация в ядро ассоциированы с хроническим воспалением и клеточным стрессом [5]. Ядерный фактор транскрипции NF-κB был открыт в 1986 году Дэвидом Балтимором. Было описано, что этот белок можно индуцировать в пре-В-клетках посредством стимуляции бактериальным липополисахаридом [11]. В настоящее время описано два пути активации NF-κB: канонический путь или классический (индуцируется TNFα через TNFR1, p50/p65) и альтернативный путь (индуцируется IL-1β через IL-1R и LPS) [8].

У пациентов с БГ выявляются нарушения в работе иммунной системы, включая дисбаланс регуляторных Т-клеток (Treg) и Th17-лимфоцитов, повышенный уровень провоспалительных цитокинов и дисфункцию макрофагов [1]. Макрофаги, трансформированные в клетки Гоше, секретируют провоспалительные цитокины (IL-1β, IL-6, TNFα), запуская хроническое воспаление во внутренних органах через активацию ядерного фактора транскрипции NF-κB по каноническому пути [13]. Липидные агрегаты стимулируют Toll-подобные рецепторы макрофагов, также запуская канонический путь активации NF-κB [4]. Гиперактивация NF-κB коррелирует с тяжестью

фиброза печени у детей при болезни Вильсона [2].

Современная терапия БГ включает ферментозаместительную терапию (ФЗТ) [5]. Несмотря на успехи ФЗТ, у части пациентов сохраняются воспалительные процессы, что указывает на участие дополнительных молекулярных механизмов, требующих новых исследований [10].

Цель работы — оценить долю клеток с активностью ядерного фактора транскрипции NF-κB в субпопуляциях лимфоцитов у детей с болезнью Гоше.

Материалы и методы

В исследование включены 58 пациентов с 1-м типом и 12 детей с 3-м типом БГ, регулярно получающих ФЗТ, в возрасте от 7 до 13 лет (Me 10,5 (7,8–13,4)). Группу сравнения составили 30 условно здоровых детей в возрасте от 4 до 12 лет (Me 7,0 (4,2–12,6)).

Иммунофенотипирование лимфоцитов и анализ доли клеток с транслокацией NF-κB выполняли на предварительно выделенных мононуклеарных клетках периферической крови (PBMC). С использованием системы Amnis ImageStreamX были проанализированы следующие клеточные популяции: CD3⁺CD19[−] (Т-лимфоциты); CD3⁺CD19⁺ (В-лимфоциты); CD3⁺CD16⁺/CD56⁺ (NK-клетки); CD3⁺CD4⁺ (Т-хелперы); CD3⁺CD8⁺ (цитотоксические Т-лимфоциты); CD3⁺CD4⁺CD8[−] (двойные негативные Т-лимфоциты); CD3⁺CD4⁺CD161⁺ (Th17-лимфоциты); CD4⁺CD25⁺CD127^{high} (активированные Т-хелперы); CD4⁺CD25⁺CD127^{low} (Treg).

Оценку доли активированных клеток проводили путем обработки клеток с использованием набора Amnis NF-κB Translocation Kit (Luminex Corporation, США), специфичного к p50. Запись пробы была выполнена согласно протоколу производителя на проточном цитометре Amnis ImageStream MkII с использованием программного обеспечения INSPIRE (Luminex, США) при 40-кратном увеличении и низкой скорости потока. Полученные изображения анализировались с использованием программного обеспечения IDEAS ImageStreamX (Luminex, США).

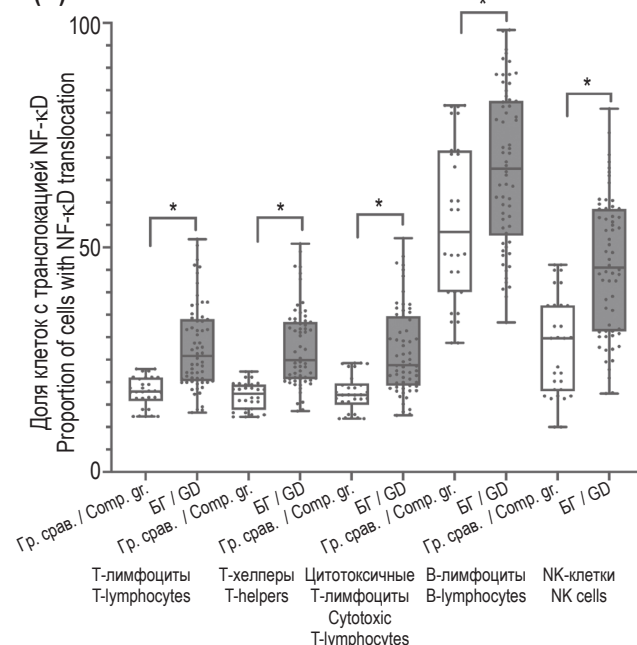
Статистический анализ выполняли с применением программного обеспечения R Studio (RStudio, PBC, США) и Prizm10 (GraphPad Software, США). Данные представлены в виде медианы и квартилей Me (Q_{0,25}–Q_{0,75}). Для сравнения групп использовали непараметрический U-критерий Манна–Уитни. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

У детей с БГ, регулярно получающих ФЗТ, увеличен процент клеток с транслокацией NF-κB в популяциях: Т-лимфоцитов, Т-хелперов, цитотоксических Т-лимфоцитов, НК-клеток, В-лимфоцитов относительно группы сравнения (рис. 1 А) и в малых популяциях CD4⁺ Т-клеток, включая Th17-типа, активированные Т-хелперы и Treg, относительно группы сравнения (рис. 1 Б).

У детей с БГ относительно группы сравнения наблюдалась повышенная активность NF-κB в основных популяциях лимфоцитов: Т-лимфоцитах — у 69% детей, Т-хелперах — у 89%, цитотоксических Т-лимфоцитах — у 74%, НК-клетках — у 66% и двойных негативных Т-лимфоцитах — у 53% детей. Однако у большинства пациентов (у 53%) уровень транслокации NF-κB в В-лимфоцитах был сопоставим с показателями группы сравнения. У 3,2% пациентов наблюдалось снижение уровня активности NF-κB ниже показателей группы сравнения во всех популяциях лимфоцитов периферической крови. Уровень транслокации в малых популяциях лимфоцитов у детей с БГ также превышал значения группы сравнения: в Th17-клетках — у 73% детей, Treg — у 64% детей, активированных Т-хелперах — у 81% детей.

А (А)



При анализе показателей пациентов с разными типами БГ выявлено, что у детей с 1-м типом БГ уровень транслокации NF-κB был значимо выше во всех исследуемых популяциях лимфоцитов (табл. 1). У пациентов с 3-м типом БГ уровень транслокации NF-κB также был значимо выше в популяциях Т-лимфоцитов, Т-хелперов, цитотоксических Т-лимфоцитов, НК-клеток, Th17-клеток, активированных Т-хелперов и Treg, относительно группы сравнения. Исключение составили популяции В-лимфоцитов и двойных негативных Т-лимфоцитов, где различия не были статистически значимыми (табл. 1). У пациентов с 3-м типом БГ было выявлено статистически значимое снижение процента клеток с транслокацией NF-κB в популяциях НК-клеток ($p_{1-3}=0,017$) и двойных негативных Т-лимфоцитов ($p_{1-3}=0,009$), относительно группы пациентов с 1-м типом БГ (табл. 1).

Полученные нами данные, свидетельствующие о системной активации транскрипционного фактора NF-κB в лимфоцитах периферической крови у детей с БГ, согласуются с выводами Курбатовой О.В. и соавт. (2024) и Zahran A.M. и соавт. (2022) о наличии хронического воспаления, причем в данный процесс, по-видимому, вовлечены все популяции лимфоцитов — как врожденного, так и адаптивного иммунитета, что также подтверждается ранее описанным по-

Б (Б)

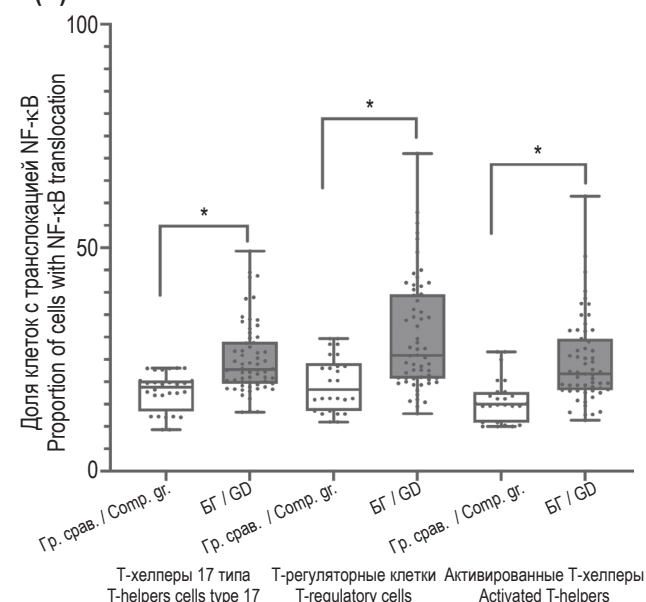


Рисунок 1. Уровень транслокации NF-κB в основных (А) и малых (Б) популяциях лимфоцитов у группы сравнения и детей с болезнью Гоше

Примечание. Гр. срав — группа сравнения; БГ — болезнь Гоше. * — статистически значимые различия $p < 0,001$.

Figure 1. Level of NF-κB translocation in major (A) and minor (B) lymphocyte populations in the comparison group and children with Gaucher disease

Note. Comp. gr., comparison group; GD, Gaucher disease. *, statistically significant differences $p < 0.001$.

ТАБЛИЦА 1. ПРОЦЕНТ КЛЕТОК С ТРАНСЛОКАЦИЕЙ NF-κB В ПОПУЛЯЦИЯХ ЛИМФОЦИТОВ У ДЕТЕЙ С БГ И УСЛОВНО ЗДОРОВОЙ ГРУППЫ ДЕТЕЙ

TABLE 1. PERCENTAGE OF CELLS WITH NF-κB TRANSLOCATION IN LYMPHOCYTE POPULATIONS IN CHILDREN WITH GD AND A CONDITIONALLY HEALTHY GROUP OF CHILDREN

Популяции Populations	Группа сравнения Comparison group	Дети с БГ 1-го типа Children with GD type 1	Дети с БГ 3-го типа Children with GD type 3	p-value
CD3 ⁺ CD19 ⁻	17,9 (16,4-21,0)	25,8 (20,8-34,3)	26,5 (17,3-34,0)	p ₀₋₁ < 0,001 p ₀₋₃ = 0,001 p ₁₋₃ = 0,564
CD3 ⁺ CD4 ⁺	17,4 (14,0-19,4)	24,9 (20,8-33,3)	31,1 (17,6-33,6)	p ₀₋₁ < 0,001 p ₀₋₃ < 0,001 p ₁₋₃ = 0,966
CD3 ⁺ CD8 ⁺	17,2 (15,6-19,4)	24,25 (20,0-33,9)	23,4 (16,8-35,9)	p ₀₋₁ < 0,001 p ₀₋₃ = 0,005 p ₁₋₃ = 0,545
CD3 ⁺ CD19 ⁺	53,5 (40,1-71,6)	68,7 (54,7-82,6)	61,2 (48,2-91,4)	p ₀₋₁ = 0,002 p ₀₋₃ = 0,067 p ₁₋₃ = 0,700
CD3 ⁺ CD16 ⁺ /CD56 ⁺	29,8 (18,3-37,1)	49,0 (32,7-58,7)	31,8 (22,8-53,9)	p ₀₋₁ < 0,001 p ₀₋₃ = 0,013 p ₁₋₃ = 0,017
CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁻	22,4 (17,7-32,9)	38,4 (25,1-48,6)	26,1 (18,0-38,0)	p ₀₋₁ < 0,001 p ₀₋₃ = 0,336 p ₁₋₃ = 0,010
CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD161 ⁺	18,6 (14,6-20,3)	24,6 (20,4-31,0)	21,7 (17,0-29,8)	p ₀₋₁ < 0,001 p ₀₋₃ = 0,017 p ₁₋₃ = 0,084
CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD127 ^{low}	18,3 (13,5-23,5)	31,0 (22,3-41,0)	28,1 (19,3-35,6)	p ₀₋₁ < 0,001 p ₀₋₃ = 0,002 p ₁₋₃ = 0,378
CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD127 ^{high}	15,0 (10,9-17,7)	24,0 (18,0-31,6)	22,1 (18,4-31,3)	p ₀₋₁ < 0,001 p ₀₋₃ < 0,001 p ₁₋₃ = 0,984

вышением количества Th17-клеток у пациентов с БГ [1, 15].

Среди детей с БГ доля клеток с транслокацией NF-κB оказалась максимальной в В-лимфоцитах, умеренной — в НК-клетках и минимальной — в Т-лимфоцитах. Эти показатели сопоставимы с группой сравнения и согласуются с результатами, полученными при других патологиях [3].

У 3,2% пациентов с БГ отмечено снижение доли клеток с транслокацией NF-κB в популяции лимфоцитов, подобная картина также была выявлена при болезни Вильсона [2].

Выводы

1. У детей с 1-м и 3-м типом болезни Гоше в популяциях лимфоцитов отмечено достоверное повышение доли клеток с транслокацией NF-κB относительно группы сравнения ($p < 0,001$).

2. У детей с 1-м типом болезни Гоше доля клеток с транслокацией NF-κB была значимо выше во всех исследуемых популяциях лимфоцитов ($p < 0,001$), а у пациентов с 3-м типом — во всех популяциях за исключением В-лимфоцитов ($p = 0,564$) и двойных негативных Т-клеток ($p = 0,336$) относительно группы сравнения.

3. При сравнении пациентов с 1-м и 3-м типом выявлено, что доля НК-клеток ($p = 0,017$) и двойных негативных Т-лимфоцитов ($p = 0,009$) с транслокацией NF-κB была статистически ниже у пациентов с 3-м типом заболевания.

4. Результаты исследования подтверждают ключевую роль сигнального пути NF-κB в поддержании хронического воспаления при болезни Гоше.

5. Дальнейшие исследования должны быть посвящены изучению влияния ферментозаместительной терапии на сигнальный путь NF-κB.

Список литературы / References

1. Курбатова О.В., Мовсисян Г.Б., Коняшин М.В., Петричук С.В., Купцова Д.Г., Радыгина Т.В., Семикина Е.Л., Потапов А.С., Фисенко А.П. Возрастная динамика показателей клеточного иммунитета, активность внутриклеточных дегидрогеназ лимфоцитов и функциональная активность нейтрофилов у детей с болезнью Гоше. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии, 2024. Т. 23, № 1. С. 128-138. [Kurbatova O.V., Movsisyan G.B., Konyashin M.V., Petrichuk S.V., Kuptsova D.G., Radygina T.V., Semikina E.L., Potapov A.S., Fisenko A.P. Age-related changes in the parameters of cellular immunity, the activity of intracellular lymphocyte dehydrogenases and functional activity of neutrophils in children with Gaucher disease. *Voprosy gematologii/onkologii i immunopatologii v pediatrii = Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology*, 2024, Vol. 23, no. 1, pp. 128-138. (In Russ.)]
2. Курбатова О.В., Петричук С.В., Купцова Д.Г., Мовсисян Г.Б., Радыгина Т.В., Комарова А.Д., Анушенко А.О., Фрейдлин Е.В., Семикина Е.Л., Потапов А.С., Фисенко А.П. Активность ядерного фактора транскрипции κB (NF- κB) в популяциях лимфоцитов у детей с болезнью Вильсона–Коновалова // Медицинская иммунология, 2023. Т. 25, № 5. С. 1205-1212. [Kurbatova O.V., Petrichuk S.V., Kuptsova D.G., Movsisyan G.B., Radygina T.V., Komarova A.D., Anushenko A.O., Freidlin E.V., Semikina E.L., Potapov A.S., Fisenko A.P. Nuclear transcription factor κB (NF- κB) activity in lymphocyte populations in children with Wilson–Konovalov disease. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2023, Vol. 25, no. 5, pp. 1205-1212. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-NTF-2799.
3. Петричук С.В., Радыгина Т.В., Купцова Д.Г., Курбатова О.В., Семикина Е.Л., Мурашкин Н.Н., Потапов А.С., Фисенко А.П. Оценка эффективности анти-tnf терапии у детей с иммунозависимыми заболеваниями по активности NF- κB в популяциях лимфоцитов // Российский иммунологический журнал, 2022. Т. 25, № 4. С. 491-498. [Petrichuk S.V., Radygina T.V., Kuptsova D.G., Kurbatova O.V., Semikina E.L., Murashkin N.N., Potapov A.S., Fisenko A.P. Evaluation of anti-TNF treatment efficiency in children with immune-dependent diseases by means of testing the NF- κB activity in lymphocyte populations. *Rossiyskiy immunologicheskii zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2022, Vol. 25, no. 4, pp. 491-498. (In Russ.)] doi: 10.46235/1028-7221-1191-EOA.
4. Aflaki E., Moaven N., Borger D.K., Lopez G., Westbroek W., Chae J.J., Marugan J., Patnaik S., Maniawang E., Gonzalez A.N., Sidransky E. Lysosomal storage and impaired autophagy lead to inflammasome activation in Gaucher macrophages. *Aging Cell*, 2016, Vol. 15, no. 1, pp. 77-88.
5. Cox T.M., Drelichman G., Cravo R., Balwani M., Burrow T.A., Martins A.M., Lukina E., Rosenbloom B., Ross L., Angell J., Puga A.C. Eliglustat compared with imiglucerase in patients with Gaucher's disease type 1 stabilised on enzyme replacement therapy: a phase 3, randomised, open-label, non-inferiority trial. *Lancet*, 2015, Vol. 385, no. 9985, pp. 2355-2362.
6. Grabowski G.A. Phenotype, diagnosis, and treatment of Gaucher's disease. *Lancet*, 2008, Vol. 372, no. 9645, pp. 1263-1271.
7. Lawrence T. The nuclear factor NF- κB pathway in inflammation. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, 2009, Vol. 1, no. 6, a001651. doi: 10.1101/cshperspect.a001651.
8. Liu T., Zhang L., Joo D., Sun S.C. NF- κB signaling in inflammation. *Signal Transduct. Target. Ther.*, 2017, Vol. 2, 17023. doi: 10.1038/sigtrans.2017.23.
9. Mignot C., Gelot A., Bessières B., Daffos F., Voyer M., Menez F., Fallet Bianco C., Odent S., le Duff D., Loget P., Fargier P., Costil J., Josset P., Roume J., Vanier M.T., Maire I., Billette de Villemeur T. Perinatal-lethal Gaucher disease. *Am. J. Med. Genet. A.*, 2003, Vol. 120A, no. 3, pp. 338-344.
10. Pandey M.K., Grabowski G.A. Immunological cells and mediators in Gaucher disease. *Blood Cells Mol. Dis.*, 2018, Vol. 68, pp. 200-205.
11. Sen R., Baltimore D. Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein Nf-kappa B by a posttranslational mechanism. *Cell*, 1986, Vol. 47, no. 6, pp. 921-928.
12. Sidransky E. Gaucher disease: insights from a rare Mendelian disorder. *Discov Med.*, 2012, Vol. 14, no. 77, pp. 273-281.
13. Şoroğlu C.V., Berkay E.G. Old disease-New reflections: Gaucher, immunity, and inflammation. *J. Cell. Mol. Med.*, 2024, Vol. 28, no. 20, e70087. doi: 10.1111/jcmm.70087.

14. Stirnemann J., Belmatoug N., Camou F., Serratrice C., Froissart R., Caillaud C., Levade T., Astudillo L., Serratrice J., Brassier A., Rose C., Billette de Villemeur T., Berger M.G. A review of gaucher disease pathophysiology, clinical presentation and treatments. *Int. J. Mol. Sci.*, 2017, Vol. 18, no. 2, 441. doi: 10.3390/ijms18020441.

15. Zahran A.M., Saad K., Elsayh K.I., Abdou M.A.A., Abo-Elgheet A.M., Elloseily E.M., Khalaf S.M., Srour S., Ahmad F.A., Elhoufey A., Ghandour A., Osman N.S. Upregulation of Cytotoxic T-cells in pediatric patients with Gaucher disease. *Sci. Rep.*, 2022, Vol. 12, no. 1, 4977. doi: 10.1038/s41598-022-08843-4.

Авторы:

Коняшин М.В. — врач клинической лабораторной диагностики лаборатории экспериментальной иммунологии и вирусологии ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

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

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

Мовсисян Г.Б. — к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории редких наследственных болезней, врач-гастроэнтеролог гастроэнтерологического отделения ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

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

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

Радыгина Т.В. — к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории экспериментальной иммунологии и вирусологии ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Семикина Е.Л. — д.м.н., руководитель лабораторного отдела ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения РФ; профессор кафедры педиатрии и детской ревматологии ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ (Сеченовский Университет), Москва, Россия

Authors:

Konyashin M.V., Clinical Laboratory Doctor, Laboratory of Experimental Immunology and Virology, National Medical Research Center for Children's Health, Moscow, Russian Federation

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

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

Movsisyan G.B., PhD (Medicine), Senior Researcher of the Laboratory of Rare Hereditary Diseases, Gastroenterologist of the Gastroenterology Department with the Hepatological Group, National Medical Research Center for Children's Health, Moscow, Russian Federation

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

Kuptsova D.G., PhD (Medicine), Junior Researcher, Clinical Laboratory Doctor, Laboratory of Experimental Immunology and Virology, National Medical Research Center for Children's Health, Moscow, Russian Federation

Radygina T.V., PhD (Medicine), Senior Researcher, Laboratory of Experimental Immunology and Virology, National Medical Research Center for Children's Health, Moscow, Russian Federation

Semikina E.L., PhD, MD (Medicine), Head, Laboratory Department, National Medical Research Center for Children's Health; Professor, Department of Pediatrics and Pediatric Rheumatology, I. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation

Потапов А.С. — д.м.н., профессор, главный научный сотрудник лаборатории научных основ детской гастроэнтерологии и гепатологии, заведующая гастроэнтерологическим отделением с гепатологической группой ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения РФ; профессор кафедры педиатрии и детской ревматологии ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения РФ (Сеченовский Университет), Москва, Россия

Фисенко А.П. — д.м.н, профессор, директор ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Potapov A.S., PhD, MD (Medicine), Professor, Chief Researcher of the Laboratory of Scientific Foundations of Pediatric Gastroenterology and Hepatology, Head of the Center for Inflammatory Bowel Diseases in Children, Head of Gastroenterology Department with Hepatology Group, National Medical Research Center for Children's Health; Professor, Department of Pediatrics and Pediatric Rheumatology, I. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation

Fisenko A.P., PhD, MD (Medicine), Professor, Director, National Medical Research Center for Children's Health, Moscow, Russian Federation

Поступила 30.03.2025
Отправлена на доработку 07.04.2025
Принята к печати 25.05.2025

Received 30.03.2025
Revision received 07.04.2025
Accepted 25.05.2025

ИММУННЫЕ МЕХАНИЗМЫ РАЗВИТИЯ ДЫХАТЕЛЬНЫХ НАРУШЕНИЙ У НЕДОНОШЕННЫХ ДЕТЕЙ

Гаева А.И., Чистякова Г.Н., Шакирова К.П., Кадочникова П.А.

ФГБУ «Уральский научно-исследовательский институт охраны материнства и младенчества»
Министерства здравоохранения РФ, г. Екатеринбург, Россия

Резюме. Недоношенность одна из актуальнейших проблем во всем мире. Ежегодно около 10% всех детей рождаются раньше срока. Успехи и неудачи в течение неонатального периода у этой категории определяют основные показатели неонатальной и младенческой смертности и инвалидизации. Для выхаживания недоношенных детей требуется высокотехнологичная и высокочувствительная по стоимости медицинская помощь. Несмотря на технологический прогресс, увеличивающийся с каждым годом объем теоретической базы знаний, изменяющийся терапевтический подход, растущий профессионализм клиницистов, не дают желаемого результата и у сверхнедоношенных детей итог выхаживания оставляет желать лучшего. Ключевым моментом в переходе от внутриутробного к внеутробному существованию является начало внешнего дыхания. Дыхание является одной из основных витальных функций нашего организма, и основные усилия по стабилизации недоношенного ребенка при рождении направлены именно на ее протекцию. Поэтому среди патологических состояний у недоношенных детей особое место занимают респираторные расстройства, включающие целый ряд заболеваний, нарушающих нормальное течение неонатального периода и характеризующихся негативными последствиями, определяющими качество жизни недоношенного ребенка и его семьи в последующем. При преждевременном родоразрешении на организм ребенка воздействуют различные пренатальные факторы, способствующие возникновению морфофункциональной незрелости и нарушению адаптационных механизмов. В результате такие новорожденные нуждаются в значительно большем объеме высокотехнологичной медицинской помощи для успешной адаптации к внеутробной жизни. Несмотря на все достигнутые успехи в протекции дыхательной функции у новорожденных путей, проведение респираторной поддержки может запускать патологические каскады, замыкающие «патологический круг», приводящий к хронизации заболевания. Основные механизмы повреждения реализуются через иммунологически опосредованные и воспалительные реакции. Патологические процессы, лежащие в их основе, запускаются еще во внутриутробном периоде вследствие дисбаланса между про- и противовоспалительными механизмами, что приводит к нарушению созревания легочной ткани. После рождения иммунная система недоношенного ребенка имеет свои особенности, сформированные антенатально. Ее состояние, условно обозначаемое как «иммунодефицит незрелости», требует дальнейшего изучения для более глубокого понимания его механизмов.

Ключевые слова: недоношенные новорожденные, легкие, иммунная система, воспаление, иммунитет

Адрес для переписки:

Гаева Александра Игоревна
ФГБУ «Уральский научно-исследовательский институт
охраны материнства и младенчества» Министерства
здравоохранения РФ
620028, Россия, г. Екатеринбург, ул. Репина, 1.
Тел.: 8 (905) 834-01-15.
E-mail: gaeva_al@mail.ru

Address for correspondence:

Alexandra I. Gaeva
Ural Research Institute for Maternity and Infant Care
1 Repin St
Ekaterinburg
620028 Russian Federation
Phone: +7 (905) 834-01-15.
E-mail: gaeva_al@mail.ru

Образец цитирования:

А.И. Гаева, Г.Н. Чистякова, К.П. Шакирова,
П.А. Кадочникова «Иммунные механизмы развития
дыхательных нарушений у недоношенных детей»
// Российский иммунологический журнал, 2025. Т. 28,
№ 3. С. 605-610.
doi: 10.46235/1028-7221-17217-IMO

© Гаева А.И. и соавт., 2025

Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

A.I. Gaeva, G.N. Chistyakova, K.P. Shakirova,
P.A. Kadochnikova "Immune mechanisms of respiratory
disorders developing in preterm infants", Russian Journal
of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2025,
Vol. 28, no. 3, pp. 605-610.
doi: 10.46235/1028-7221-17217-IMO

© Gaeva A.I. et al., 2025

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

DOI: 10.46235/1028-7221-17217-IMO

IMMUNE MECHANISMS OF RESPIRATORY DISORDERS DEVELOPING IN PRETERM INFANTS

Gaeva A.I., Chistyakova G.N., Shakirova K.P., Kadochnikova P.A.

Ural Research Institute for Maternity and Infant Care, Ekaterinburg, Russian Federation

Abstract. Preterm birth is one of the most urgent problems in neonatology. Every year, about 10% of all children are born before their due date. Successful or failed care over the neonatal period in this category are the main factors of neonatal and infant mortality and disability. High-tech and expensive medical services are required to care for premature infants. Despite technological advances, the increasing amount of scientific knowledge, changing therapeutic approaches, growing skills of clinicians do not provide the desired efficiency, and the results of medical care still are far from success for the extra-premature children. The key issue in transition from intrauterine to extra-uterine life is the time point of external respiration. The main efforts for sustaining the preterm child are aimed at its respiratory protection, since breathing is one of the main vital functions. Therefore, respiratory disorders occupy a special place among the pathologies in premature infants. They include a number of diseases that impair normal course of neonatal period, being characterized by negative consequences, determining the quality of life in premature children as well as their families. In the premature birth of a child, various prenatal factors affect the body, contributing to the morphofunctional immaturity and altered adaptation mechanisms. As a result, such newborns need much more high-tech medical care to successfully adapt to life outside the womb. Despite all the advances in protection of respiratory function in the newborn, the implementation of respiratory support can trigger pathological cascades, which result in a «pathological circle» leading to chronic disease. The main mechanisms of damage are realized through immune-mediated and inflammatory reactions. The underlying pathological events are triggered during the intrauterine period, due to imbalance between pro- and anti-inflammatory mechanisms, thus causing impairment of lung maturation. After birth, the immune system of a premature baby has its own features that are formed ante partum. This condition, arbitrarily referred to as «immaturity immunodeficiency», requires further study for deeper understanding of its mechanisms.

Keywords: preterm newborns, lungs, immune system, inflammation, immunity

Введение

Неонатальный период один из самых важных, сложных, скоротечных и критических периодов жизни человека. Его смело можно назвать фундаментальным в формировании здоровья на все последующие годы. Для обеспечения выживания новорожденного переход от внутриутробной к внеутробной жизни требует незамедлительного включения быстрых, скоординированных и взаимосвязанных между собой адаптационных механизмов, в которых задействованы все органы и системы, а любые минимальные сбои могут привести к молниеносно возникшим фатальным последствиям [8, 11, 12].

Возникновение дыхательной недостаточности у новорожденных детей в первые часы жизни чаще всего связано с незрелостью легочной ткани, врожденным инфекционно-воспалительным процессом, типа пневмония или сепсис, или наличием врожденных пороков развития дыхательной или сердечно-сосудистой системы на органном уровне.

В результате такие новорожденные нуждаются в значительно большем объеме высокотехнологичной медицинской помощи для успешного перехода к внеутробной жизни.

Врожденная иммунная система присутствует у всех новорожденных детей вне зависимости от срока гестации, она выработана в ходе филогенеза и обеспечивает раннюю линию защиты от микробов, но ее функциональность и зрелость к моменту рождения остается предметом для обсуждения. Ключевые компоненты врожденной иммунной системы включают клеточные и биохимические механизмы, такие как физические и химические барьеры слоя эпителиальных и эндотелиальных клеток и вещества, вырабатываемые ими для защиты, фагоцититарные клетки, естественные клетки-киллеры и антигенпрезентирующие клетки, а также гуморальные факторы, такие как цитокины, антимикробные пептиды и факторы комплемента. Эти компоненты присутствуют на эпителиальных, эндотелиальных барьерах и в тканевых жидкостях, обеспечивая быстрый и широкий защитный щит от различных патогенов [7].

Несмотря на то, что все актуальные терапевтические усилия и респираторные стратегии регламентированы и контролируемые, выполнение сверхзадачи незрелым, соответственно, неготовым к полноценному выполнению своей функции органу может приводить к запуску патологических каскадов и дополнительной трав-

матизации, замыкающий «патологический круг» и в итоге приводящих к хронизации заболевания.

Развитие и созревание легких

Дыхание является одной из основных витальных функций нашего организма, и основные усилия по стабилизации недоношенного ребенка при рождении направлены именно на ее протекцию. Поэтому среди патологических состояний у недоношенных детей особое место занимают респираторные расстройства, включающие целый ряд заболеваний, нарушающих нормальное течение неонатального периода и характеризующихся негативными последствиями, определяющими качество жизни недоношенного ребенка и его семьи в последующем. По данным различных авторов, несмотря на все достигнутые успехи в клинической практике и расширения знаний в фундаментальном понимании патологических процессов, частота дыхательных нарушений у новорожденных детей не имеет тенденции к снижению в последние годы и колеблется от 36% до 76% [2, 11]. У детей с гестационным возрастом 22-24 недели частота развития дыхательных нарушений достигает 100%. Это связано прежде всего с тем, что при рождении раньше срока нормальное развитие легкого нарушается, при этом выраженность последующих изменений зависит от достигнутой стадии их фетального развития.

Дыхательная система выполняет не только газообменную функцию, но и вносит немалую роль в поддержание гомеостаза организма за счет реализации такой функции, как защитная. Во время процесса дыхания легкие взаимодействуют с окружающей средой, которую нельзя назвать доброжелательной с учетом вдыхаемого количества вирусов, бактерий с их патогенами, а также токсических веществ, аллергенов и прочего. К моменту рождения дыхательная система доношенного ребенка обладает разнообразным количеством защитных методов — это и морфофункциональные особенности строения, обуславливающие аэродинамическую систему и кинетические механизмы, крове- и лимфоток, неспецифические гуморальные и клеточные факторы обезвреживания чужеродных частиц за счет ферментных реакций, цитотаксиса, пино- и фагоцитоза макрофагов, и специфические иммунные механизмы. Все вышеперечисленные механизмы генетически детерминированы, и их закладка идет параллельно с внутриутробным морфофункциональным формированием системы. Недоношенным детям многие защитные механизмы не доступны, в силу того, что они к моменту рождения не сформировались [1].

Может быть, поэтому легкие и являются наиболее уязвимым органом с высокой долей хронизацией патологического процесса у сверхнедоношенных детей.

Развитие легких плода — это сложный и точный стадийный биологический процесс, в кото-

ром участвуют различные клетки-предшественницы, белки и гены, сигнальные пути. Каждая стадия характеризуется уникальной последовательностью морфологических преобразований, предопределенных активацией или деактивацией сигнальных путей [3, 12].

Для нормального альвеоло- и васкулогенеза очень важен баланс сигнальных путей, управляющих альвеолярным, мезенхимальным и сосудистым развитием [10].

Гормональная сигнализация играет не меньшую роль, чем генетика в развитии и созревании легких. Половые гормоны, глюкокортикоиды, гормоны щитовидной железы, инсулиноподобный фактор роста-1 и рилизинг-гормон гормона роста участвуют в процессах пролиферации, дифференцировки клеток и производстве сурфактанта [3, 4, 12].

В настоящее время известно, что баланс между выработкой активных форм кислорода и антиоксидантной защитой может быть нарушен еще до родов при таких состояниях, как преэклампсия, хроническая гипертония, ожирение, инфекции, преждевременный разрыв плодных оболочек и задержка внутриутробного развития. Во всех этих состояниях отмечены высокие уровни цитокинов (TNF α , IL-8, IL-1 β , IL-6) и активные формы кислорода, которые вызывают прямое деструктивное воздействие на легкие плода. Провоспалительные цитокины запускают реакцию врожденной легочной иммунной системы с привлечением нейтрофилов и макрофагов и опосредованно замедляют такие процессы, как ангиогенез, морфогенез и развитие клеток, что приводит к остановке развития легких. Соответственно, внутриутробное воздействие окислительного стресса является значительным фактором риска развития дыхательных нарушений у недоношенных детей уже после рождения [3, 4, 12].

Необходимо сказать, что процесс созревания легких плода сложен и включает в себя взаимодействие различных факторов, таких как материнские, генетические, гормональные и факторы, обеспечивающие рост и нормальное функционирование системы к доношенному сроку. За счет нарушения баланса провоспалительных и воспалительных механизмов формирования патологических процессов запускается уже на ранних стадиях внутриутробного развития, нарушая четко организованный процесс развития и созревания.

Иммунная система у новорожденных детей

Иммунная архитектура легких состоит из обширной сети клеток врожденного иммунитета, которые вызывают адаптивные иммунные реакции. Баланс иммунных реакций, который включает активное участие альвеолярных эпителиальных клеток и макрофагов, определяет поддержание иммунного гомеостаза в легких [6].

Альвеолярный эпителий неоднороден и представлен клетками нескольких типов. Альвеоциты I порядка покрывают 99% поверхности легких, плотно связаны между собой и альвеоцитами II порядка [2, 6].

Количество альвеолоцитов II порядка приблизительно равно числу альвеолоцитов I порядка, среди которых они лежат поодиночке или мелкими группами, но покрывают они только 2-5% поверхности альвеол. Появляясь между 20-й и 24-й неделями беременности из альвеоцитов I порядка, они отвечают за метаболизм сурфактанта. Альвеоциты II типа обладают высокой иммунологической активностью, что обусловлено их способностью секретировать сурфактантные белки (SP-A, SP-B, SP-C, SP-D) и антимикробные пептиды (интерферон, лизоцим). Кроме того, они участвуют в детоксикации ксенобиотиков, опосредуя процессы окислительного стресса.

Белки увеличивают скорость секреции фосфолипидов разделу фаз «воздух-жидкость». SP-B, SP-C ответственны за снижение поверхностного натяжения, также SP-C играет иммуномодулирующую роль в устранении легочных инфекций, SP-A и SP-D являются коллектинами и играют роль во врожденном иммунитете за счет участия в процессах распознавания ряда организмов, стимуляции хемотаксиса и фагоцитоза [2, 5].

Другие представители клеточного состава легких, отвечающие за иммунные реакции, — это макрофаги. Существует два типа макрофагов нижних дыхательных путей — альвеолярные и интерстициальные. Оба вида вызывают устойчивые реакции на различные стимулирующие факторы и обладают врожденным супрессивным действием. Интерстициальные макрофаги выполняют регуляторную функцию в легочной ткани, имеют более высокую склонность к высвобождению цитокинов, связанных с адаптивным иммунитетом. Действие альвеолярных макрофагов регулируются неспецифическими механизмами, такими как фагоцитоз, фактор некроза опухоли альфа (TNF α), интерферон гамма [6].

Взаимодействие макрофагов и альвеоцитов происходит как в физиологических условиях, так и лежит в основе многих патологических процессов. В центре внимания многих исследований были характерные воспалительные реакции, спровоцированные пре- и ранними постнатальными факторами. Связь между незрелостью и пренатальными состояниями, а также постнатальным воздействием искусственной вентиляции легких и кислородной токсичностью с дисбалансом про- и противовоспалительных регуляторных сетей очевидна. В этих условиях высвобождение цитокинов, активность протеазы и постоянное присутствие врожденных иммунных клеток в легких приводят к патологическим

процессам, способствующим повреждению легких [2, 3, 6, 7, 12].

В основе развития дыхательных нарушений у недоношенных детей типовой патологический процесс асептического воспаления морфофункционально незрелой легочной ткани со всеми характерными этапам: альтеративно-дистрофическими, сосудисто-экссудативными и пролиферативными. Далее каскад воспалительных реакций и продукты, образующиеся в результате (фибриноген, альбумин, клеточный детрит некротизированных эпителиальных клеток, компоненты сурфактанта) приводят к формированию «гиалиновых мембран», нарушающих функцию легкого, усугубляющие дефицит сурфактанта и замыкания формирования «порочного круга» респираторного дистресс-синдрома новорожденного (РДС). В дальнейшем возможны два варианта развития событий — репарация или хронизация процесса. Репарация возможна при фагоцитировании макрофагами гиалиновых мембран и восстановлении количества сурфактанта в альвеолах [2].

Острый РДС развивается после тяжелого перинатального повреждения легких («шоковые легкие») вследствие асфиксии, инфекции (сепсис, пневмония), шока, легочного кровотечения или токсических. Разрушение сурфактанта возможно при химическом пневмоните в результате гастроэзофагеального рефлюкса, также являющегося фактором риска развития бронхолегочной дисплазии (БЛД) [2].

Так, недоношенные дети, рожденные в воспалительной среде, особенно при наличии хориоамнионита у матери, имеют повышенные маркеры воспаления легких, и с более высокой долей вероятности у них происходит переход РДС в хроническое заболевание легких, БЛД. В моделях на животных было показано, что применение липополисахарида (ЛПС) или эндотоксина *Escherichia coli* в качестве стимулов для провоспалительной реакции пагубно влияет на развитие альвеол и сосудов. Однако в научной литературе наблюдается противоречивость относительно связи между гистологическим или клиническим хориоамнионитом и БЛД, поскольку их основные механизмы и роль пренатального воспаления остаются не полностью выясненными. Возможно, причина кроется в особенностях иммунитета новорожденных, а точнее в его «незрелости», которую демонстрируют недоношенные дети [7].

Неонатальный период играет критически важную роль в формировании иммунной системы новорожденного. Ключевых аспектов, которые подчеркивают его уникальность с иммунологической точки зрения, несколько. Во-первых, это первичное воздействие антигенов, таких как микробы из окружающей среды, что способствует активации его иммунной системы. Эти ранние взаимодействия помогают формировать адаптивный иммунный ответ в будущем. Во-вторых,

в этот период происходит формирование микробиоты, которая начинает развиваться сразу после рождения и играет важную роль в иммунном развитии. Она помогает обучать иммунную систему, а также защищает от патогенных микроорганизмов. В-третьих, происходит инициация вторичных лимфатических структур: развитие и активация лимфатических узлов и других вторичных лимфатических органов, что достаточно критично для формирования эффективного иммунного ответа. Пассивный иммунитет новорожденные получают из антитела от матери через плаценту и грудное молоко, что обеспечивает временную защиту от инфекций, пока их собственная иммунная система еще не полностью развита. В этот период происходит инициация механизмов иммунной защиты за счет активации различных клеток иммунной системы, таких как Т-клетки и В-клетки, которые начинают распознавать и реагировать на патогены. Эти факторы подчеркивают важность неонатального периода для формирования устойчивого и эффективного иммунного ответа, который будет защищать новорожденного на протяжении всей жизни [13].

Новорожденные при рождении имеют наивную иммунную систему, которая должна адаптироваться к внеутробной среде для предотвращения инфекций. Трансплацентарная передача патоген-специфических антител и других медиаторов иммунитета от матери к плоду во время беременности, а после рождения иммунитет, полученный из грудного молока, защищает новорожденных от инфекции. Поскольку пассивный иммунитет в значительной степени опосредован антителами, неонатальный иммунитет сильно зависит от материнской концентрации соответствующих специфических антител во время беременности. Если титры низкие или быстро ослабевают после рождения, защита, переданная ребенку, может быть недостаточной для предотвращения заболевания. Более того, новые концепции предполагают, что матери могут передавать активный иммунитет новорожденным посредством вертикальной передачи патоген-специфических Т-клеток [13].

Преждевременные роды не являются физиологическими и ассоциированы с патологическими состояниями, возникшими в ходе беременности. Поэтому процесс появления и становления лактации происходит более медленно, сохранение ее требует больших усилий, а также ценность образующегося молока в проекции повышенных потребностей недоношенного ребенка оставляет желать лучшего. Ситуация осложняется еще и тем, что к моменту рождения не у всех недоношенных детей сформирован полноценный сосательный рефлекс, желудочно-кишечный тракт морфофункционально незрелый, поэтому часть из этих детей вынужденно находится на искусственном зондовом вскармливании, которое ис-

ключает механизм передачи материнского иммунитета через грудное молоко.

Быстрое расширение микробиоты и ее взаимодействие с иммунной системой являются отличительными чертами первых постнатальных дней и недель. Источником первоначальной колонизации является мать. Факторы, влияющие на состав микробиом, включают гестационный возраст, способ родов, факторы окружающей среды (особенно в условиях больницы), питание младенца (грудное молоко или молочная смесь), лечение антибиотиками [7].

На процесс микробной колонизации оказывают роль молекулярные, клеточные и эпигенетические программы, согласованные действия которых обеспечивает рост нормальной флоры и подавление патологической, при этом не допускает чрезмерного воспаления и аутоиммунитета. В свою очередь, микробиота является частью иммунной системы и фактором, влияющим на становление приобретенного иммунитета за счет воздействия антигенов.

Эпителий легких богат иммунными клетками, включая альвеолярные макрофаги и эпителиальные клетки, которые способны вырабатывать антимикробные пептиды (АМП) для защиты легких от патогенов, попадающих в дыхательные пути. АМП составляют важную часть врожденного барьера, их основная роль в поддержании равномерной колонизации микроорганизмами поверхностей, особенно кожи, легких и кишечника. Исследования недоношенных новорожденных выявляют сниженные концентрации циркулирующих, внутриклеточных и эпителиальных антимикробных пептидов, что способствует снижению иммунной защиты, позволяющей определенным бактериям легче колонизировать и инфицировать дыхательные пути недоношенных детей. На данный момент не достаточно данных, освещающих вопрос о том, какой уровень АМР у недоношенных детей по сравнению с доношенными детьми и в каком объеме они представлены [7].

Выводы

В основе развития дыхательных нарушений у новорожденных детей лежат типовые иммунологические реакции, запускающие про- и противовоспалительные каскады. Несмотря на многочисленные полученные результаты, посвященные адаптивному и врожденному иммунитету новорожденных и их взаимодействию, проливающие свет на основные механизмы остаются неполными и противоречивыми. Убедительно можно утверждать лишь одно, что иммунитет недоношенного ребенка имеет свои особенности, которые закладываются еще внутриутробно, он является уникальным состоянием, требующим дополнительного изучения для улучшения перинатальных исходов.

Список литературы / References

1. Мороз В.В., Тучина Л.М., Порошенко Г.Г. О механизмах защиты легких // Общая реаниматология, 2005. Т. 1, № 5. С. 69-77. [Moroz V.V., Tuchina L.M., Poroshenko G.G. Mechanisms of Protection of the Lung. *Obshchaya reanimatologiya = General Reanimatology*, 2005, Vol. 1, no. 5, pp. 69-77. (In Russ.)]
2. Овсянников Д.Ю., Кравчук Д.А., Николаева Д.Ю. Клиническая патофизиология органов дыхания недоношенных детей // Неонатология: новости, мнения, обучение, 2018. Т. 6, № 3. С. 74-98. [Ovsyannikov D.Yu., Kravchuk D.A., Nikolaeva D.Yu. Clinical pathophysiology of the respiratory system in preterm infants. *Neonatologiya: novosti, mneniya, obucheniye = Neonatology: News, Opinions, Training*, 2018, Vol. 6, no. 3, pp. 74-98. (In Russ.)]
3. Ancius-Craucius M., Cucerea M.C., Tripon F., Craucius G.A., Bănescu C.V. Descriptive and functional genomics in neonatal respiratory distress syndrome: from lung development to targeted therapies. *Int. J. Mol. Sci.*, 2024, Vol. 25, no. 1, 649. doi: 10.3390/ijms25010649.
4. Cannavò L., Perrone S., Viola V., Marseglia L., Di Rosa G., Gitto E. Oxidative stress and respiratory diseases in preterm newborns. *Int. J. Mol. Sci.*, 2021, Vol. 22, no. 22, 12504. doi: 10.3390/ijms222212504.
5. Cooney A.L., Wambach J.A., Sinn P.L., McCray P.B. Gene therapy potential for genetic disorders of surfactant dysfunction. *Front. Genome Ed.*, 2022, Vol. 3, 785829. doi: 10.3389/fgeed.2021.785829.
6. Gopallawa I., Dehinwal R., Bhatia V., Gujar V., Chirmule N. A four-part guide to lung immunology: Invasion, inflammation, immunity, and intervention. *Front. Immunol.*, 2023, Vol. 14, 1119564. doi: 10.3389/fimmu.2023.1119564.
7. Marissen J., Reichert L., Härtel C., Fortman, M.I., Faust K., Msanga D., Harder J., Zemlin M., Gomez de Agüero M., Masjosthusmann K., Humberg A. Antimicrobial peptides (AMPs) and the microbiome in preterm infants: consequences and opportunities for future therapeutics. *Int. J. Mol. Sci.*, 2024, Vol. 25, no. 12, 6684. doi: 10.3390/ijms25126684.
8. Morton S.U., Brodsky D. Fetal physiology and the transition to extrauterine life. *Clin. Perinatol.*, 2016, Vol. 43, no. 3, pp. 395-407.
9. Noguee LM. Genetic causes of surfactant protein abnormalities. *Curr Opin Pediatr.*, 2019, Vol. 31, no. 3, pp. 330-339.
10. Noguee L.M., Ryan R.M. Genetic testing for neonatal respiratory disease. *Children*, 2021, Vol. 8, no. 3, 216. doi: 10.3390/CHILDREN8030216.
11. Verklan M.T. Physiologic variability during transition to extrauterine life. *Crit. Care Nurs.Q.*, 2002, Vol. 24, no. 4, pp. 41-56; quiz 2 p following 83.
12. Yaremenko A.V., Pechnikova N.A., Porpodis K., Damdounis S., Aggeli A., Theodora P., Domvri K. Association of fetal lung development disorders with adult diseases. *J. Pers. Med.*, 2024, Vol. 14, no. 4, 368. doi: 10.3390/JPM14040368.
13. Zemlin M., Härtel C. Neonatal Immunology. *Int. J. Mol. Sci.*, 2024, Vol. 25, no. 17, 9395. doi: 10.3390/ijms25179395.

Авторы:

Гаева А.И. — врач — анестезиолог-реаниматолог, заместитель директора по педиатрической работе, ФГБУ «Уральский научно-исследовательский институт охраны материнства и младенчества» Министерства здравоохранения РФ, г. Екатеринбург, Россия

Чистякова Г.Н. — д.м.н., профессор, заведующая отделением иммунологии, микробиологии, патоморфологии и цитодиагностики ФГБУ «Уральский научно-исследовательский институт охраны материнства и младенчества» Министерства здравоохранения РФ, г. Екатеринбург, Россия

Шакирова К.П. — к.м.н., врач — анестезиолог-реаниматолог, заведующая отделением реанимации и интенсивной терапии новорожденных, ФГБУ «Уральский научно-исследовательский институт охраны материнства и младенчества» Министерства здравоохранения РФ, г. Екатеринбург, Россия

Кадоchnikova П.А. — врач — анестезиолог-реаниматолог отделения реанимации и интенсивной терапии новорожденных ФГБУ «Уральский научно-исследовательский институт охраны материнства и младенчества» Министерства здравоохранения РФ, г. Екатеринбург, Россия

Authors:

Gaeva A.I., Anesthesiologist and Intensive Care Physician, Deputy Director for Pediatrics, Ural Research Institute for Maternity and Infant Care, Ekaterinburg, Russian Federation

Chistyakova G.N., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Microbiology, Immunology, Pathomorphology and Cytodiagnostics, Ural Research Institute for Maternity and Infant Care, Ekaterinburg, Russian Federation

Shakirova K.P., PhD (Medicine), Anesthesiologist and Intensive Care Physician, Head, Department of Resuscitation and Intensive Care of Newborns, Ural Research Institute for Maternity and Infant Care, Ekaterinburg, Russian Federation

Kadochnikova P.A., Anesthesiologist and Intensive Care Physician, Department of Resuscitation and Intensive Care of Newborns, Ural Research Institute for Maternity and Infant Care, Ekaterinburg, Russian Federation

Поступила 01.04.2025
Отправлена на доработку 15.04.2025
Принята к печати 25.05.2025

Received 01.04.2025
Revision received 15.04.2025
Accepted 25.05.2025

ОЦЕНКА ДИАГНОСТИЧЕСКОЙ ЗНАЧИМОСТИ ЦИТОКИНОВ И микроРНК У ДОНОШЕННЫХ НОВОРОЖДЕННЫХ С ВРОЖДЕННЫМИ ПОРОКАМИ СЕРДЦА В КАЧЕСТВЕ БИОМАРКЕРОВ НЕКРОТИЗИРУЮЩЕГО ЭНТЕРОКОЛИТА

Зайкова Е.К.¹, Каплина А.В.¹, Петрова Н.А.¹, Первунина Т.М.¹,
Костарева А.А.¹, Калинина О.В.^{1,2}

¹ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова» Министерства
здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

² ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии
имени Пастера», Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Новорожденные с дуктус-зависимыми врожденными пороками сердца (ВПС) находятся в группе повышенного риска развития некротизирующего энтероколита (НЭК) — тяжелого воспалительного заболевания кишечника. Принимая во внимание, что ранние симптомы НЭК неспецифичны и вариабельны, актуальной задачей является поиск специфических диагностических биомаркеров как для диагностики НЭК, так и для стратификации риска его развития и проведения профилактических мероприятий. Перспективными биомаркерами НЭК могут быть цитокины и микроРНК, регулирующие различные биологические процессы. Цель исследования — оценить диагностический потенциал уровней 31 цитокина и трех микроРНК в плазме крови новорожденных с ВПС в качестве специфических биомаркеров НЭК. В исследование было включено 38 доношенных новорожденных с ВПС, перенесших кардиохирургическое лечение на 8-е (6–12) сутки жизни, у 10 из которых развился НЭК в раннем послеоперационном периоде. Определение уровней цитокинов в образцах плазмы крови, полученных от 28 новорожденных без НЭК и 10 новорожденных с НЭК, проводили с использованием набора MILLIPLEX Human Cytokine/Chemokine/Growth Factor Panel A (MilliporeSigma, США) на приборе MAGPIX (Luminex, США). Выделение тотальной РНК из образцов плазмы крови, полученных от 14 новорожденных без НЭК и 10 новорожденных с НЭК, проводили с использова-

Адрес для переписки:

Зайкова Екатерина Константиновна
ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский
центр имени В.А. Алмазова» Министерства
здравоохранения РФ
197341, Россия, Санкт-Петербург, ул. Аккуратова, 2.
Тел.: 8 (981) 848-39-04.
E-mail: Catherine3452@yandex.ru

Address for correspondence:

Ekaterina K. Zaikova
V. Almazov National Medical Research Centre
2 Akkuratov St
St. Petersburg
197341 Russian Federation
Phone: +7 (981) 848-39-04.
E-mail: Catherine3452@yandex.ru

Образец цитирования:

Е.К. Зайкова, А.В. Каплина, Н.А. Петрова,
Т.М. Первунина, А.А. Костарева, О.В. Калинина
«Оценка диагностической значимости цитокинов
и микроРНК у доношенных новорожденных
с врожденными пороками сердца в качестве
биомаркеров некротизирующего энтероколита»
// Российский иммунологический журнал, 2025. Т. 28,
№ 3. С. 611–618.
doi: 10.46235/1028-7221-17136-DVO

© Зайкова Е.К. и соавт., 2025
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

E.K. Zaikova, A.V. Kaplina, N.A. Petrova, T.M. Pervunina,
A.A. Kostareva, O.V. Kalinina “Diagnostic value of cytokines
and microRNAs as biomarkers of necrotizing enterocolitis in
term newborns with congenital heart defects”, Russian Journal
of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2025,
Vol. 28, no. 3, pp. 611–618.
doi: 10.46235/1028-7221-17136-DVO

© Zaikova E.K. et al., 2025
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.46235/1028-7221-17136-DVO

нием реагента TRIzol LS (Thermo Fisher Scientific, США) и добавлением внешнего синтетического контроля cel-miR-39-3p для последующей нормализации данных. Определение уровней экспрессии микроРНК-155-5p, микроРНК-221-3p и микроРНК-451a проводили с использованием наборов The TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific, США) и TaqMan MicroRNA Assays (Life Technologies, США). Установлено, что в плазме крови новорожденных с НЭК уровни IL-8 и M-CSF были статистически значимо выше в 1,6 ($p = 0,037$) и 12,6 ($p = 0,006$) раз соответственно, чем у новорожденных без НЭК. Относительный уровень miR-451a у новорожденных с НЭК был в 5 раз меньше, по сравнению с таковым у новорожденных без НЭК. Достоверных отличий в уровнях остальных проанализированных цитокинов и микроРНК выявлено не было. Модель, включающая три биомаркера miR-451a, IL-8 и M-CSF, обладает высоким диагностическим потенциалом (ППК = 0,901 с чувствительностью 85,7% и специфичностью 84,6%) для диагностики НЭК в рутинной клинической практике.

Ключевые слова: некротизирующий энтероколит, врожденные пороки сердца, биомаркеры, M-CSF, IL-8, микроРНК-451a

DIAGNOSTIC VALUE OF CYTOKINES AND microRNAs AS BIOMARKERS OF NECROTIZING ENTEROCOLITIS IN TERM NEWBORNS WITH CONGENITAL HEART DEFECTS

Zaikova E.K.^a, Kaplina A.V.^a, Petrova N.A.^a, Pervunina T.M.^a,
Kostareva A.A.^a, Kalinina O.V.^{a, b}

^a V. Almazov National Medical Research Centre, St. Petersburg, Russian Federation

^b Saint Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. Newborns with ductus-dependent congenital heart defects (CHD) are at increased risk of developing necrotizing enterocolitis (NEC), a severe inflammatory bowel disease. Given that early symptoms of NEC are nonspecific, an urgent task is to find specific diagnostic biomarkers both for diagnosing NEC and for stratifying the risk of its development and implementing preventive measures. Cytokines and microRNAs are promising NEC biomarkers since they regulate various biological processes. The aim of the study was to evaluate the diagnostic potential of the levels of 31 cytokines and three microRNAs as specific NEC biomarkers in blood plasma of newborns with CHD. The study included 38 term newborns with CHD who underwent cardiac surgery on the 8th (6-12) day of life, ten of whom developed NEC postoperatively. Cytokine levels in plasma samples from 28 newborns without NEC and 10 newborns with NEC were measured using the MILLIPLEX Human Cytokine/Chemokine/Growth Factor Panel A kit (MilliporeSigma, USA) with a MAGPIX instrument (Luminex, USA). Total RNA was isolated from plasma samples of 14 babies without NEC, and 10 newborns with NEC, using TRIzol LS reagent (Thermo Fisher Scientific, USA) with external synthetic control cel-miR-39-3p for subsequent data normalization. Expression levels of microRNA-155-5p, microRNA-221-3p, and microRNA-451a were measured using TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific, USA) and TaqMan MicroRNA Assays (Life Technologies, USA). In newborns with NEC, the levels of IL-8 and M-CSF were 1.6 ($p = 0.037$) and 12.6 ($p = 0.006$) times higher, respectively, than in newborns without NEC. The relative expression of miR-451a was 5 times lower in newborns with NEC than in newborns without NEC. No significant differences were found for the levels of other analyzed cytokines and microRNAs. The model including three biomarkers (miR-451a, IL-8 and M-CSF) has shown a high diagnostic potential (AUC = 0.901 with a sensitivity of 85.7% and a specificity of 84.6%) for the diagnosis of NEC in routine clinical practice.

Keywords: necrotizing enterocolitis, congenital heart defects, biomarkers, M-CSF, IL-8, microRNA-451a

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда в рамках научно-го проекта № 19-75-20076.

Введение

Новорожденные с дуктус-зависимыми врожденными пороками сердца (ВПС) находятся в группе повышенного риска развития некротизирующего энтероколита (НЭК) — тяжелого воспалительного заболевания кишечника. Клиническое течение дуктус-зависимых ВПС сопровождается гемодинамической нестабильностью, гипоксией, прогрессирующей сердечно-сосудистой недостаточностью, что является показанием для кардиохирургической коррекции в первые недели жизни. Частота развития НЭК у детей с ВПС, перенесших кардиохирургическое лечение, достигает 61%, а летальность — 24% [5].

Молекулярные механизмы патогенеза НЭК у новорожденных с ВПС мало изучены. Считается, что развитие НЭК у таких детей в основном ассоциировано с гипоперфузией и ишемией кишечника, системным воспалением, что приводит к продукции широкого спектра цитокинов, активации иммунных клеток, нарушению целостности эпителиального барьера и некрозу [11]. В последние годы в качестве сигнальных молекул, участвующих в патогенезе НЭК, рассматривают некодирующие регуляторные микроРНК (miR), регулирующие различные биологические процессы, в том числе воспаление, дифференцировку, активацию, хемотаксис и апоптоз иммунных клеток, посредством посттранскрипционной регуляции экспрессии генов.

Учитывая неспецифичность клинических проявлений при дебюте заболевания, высокую летальность и отсутствие специфической лабораторной диагностики, актуальной задачей является поиск специфических биомаркеров, позволяющих выявлять заболевание на ранних стадиях.

Цель исследования — оценить диагностический потенциал уровней цитокинов и микроРНК в плазме крови новорожденных с дуктус-зависимыми ВПС в качестве специфических биомаркеров НЭК.

Материалы и методы

В когортное исследование было включено 38 доношенных новорожденных (массой тела > 2500 г и сроком гестации > 37 нед.) с ВПС, родившихся и перенесших кардиохирургическое лечение на 8-е (6-12) сутки жизни в ФГБУ «НМИЦ им В.А. Алмазова» в 2019-2020 гг. На 3-и (1-5) сутки после операции у 10 новорожденных

на основе клинических симптомов, рентгенологических и лабораторных данных был диагностирован НЭК (стадия IIA — 9 детей, IIIA — 1 ребенок, согласно классификации М. Bell в модификации М. Walsh и R. Kliegman).

Исследование было выполнено в соответствии с принципами Хельсинкской декларации и одобрено этическим комитетом Национального медицинского исследовательского центра им. В.А. Алмазова (протокол № 1702-21 от 15 февраля 2021). Письменное информированное согласие было получено от родителей всех новорожденных, включенных в исследование.

Взятие образцов периферической крови осуществляли в стерильные пробирки с КЗ-ЭДТА на 6-е (5-7-е) сутки после операции. Образцы плазмы крови получали двухэтапным центрифугированием цельной крови, при 1500g в течение 15 минут и хранили при температуре -40 °C до использования.

Определение уровней (пг/мл) интерлейкинов IL-1 α , IL-1 β , IL-1ra, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8 (CXCL8), IL-9, IL-10, IL-12p40, IL-12p70, IL-13, IL-15, IL-17A, IL-17E/IL-25, IL-17F, IL-18, IL-22, IL-27 и факторов роста G-CSF (колониестимулирующий фактор гранулоцитов), M-CSF (макрофагальный колониестимулирующий фактор), GM-CSF (гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор), VEGF-A (васкулоэндотелиальный фактор роста), PDGF-AA, AB/BB (факторы роста тромбоцитов), FGF-2 (фактор роста фибробластов-2), EGF (эпидермальный фактор роста) и TGF α (трансформирующий фактор роста) в образцах плазмы крови, полученных от 28 новорожденных без НЭК и 10 новорожденных с НЭК, проводили с использованием набора MILLIPLEX Human Cytokine/Chemokine/Growth Factor Panel A (MilliporeSigma, США) на приборе MAGPIX (Luminex, США).

Выделение РНК из образцов плазмы крови, полученных от 14 новорожденных без НЭК и 10 новорожденных с НЭК, проводили реагентом TRIzol LS (Thermo Fisher Scientific, США) с добавлением внешнего синтетического контроля cel-miR-39-3p для последующей нормализации данных, как описано ранее [8]. Определение уровней экспрессии микроРНК-155-5p, микроРНК-221-3p и микроРНК-451a проводили наборами The TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific, США) и TaqMan MicroRNA Assays (Assay ID 002623, 000524, 001141 и 000200) (Life Technologies, США). Для расчета применяли метод $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Статистическую обработку данных выполняли в программах Statistica 10.0 (StatSoft, США),

MedCalc 23.0.2 (MedCalc Software Ltd, Бельгия) и Prism 9 (GraphPad, США). Качественные показатели представляли в виде абсолютных (n) и относительных (%) частот, количественные — в виде медианы (Me) и интерквартильного размаха ($Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$). Статистическую значимость различий качественных переменных оценивали точным критерием Фишера, количественных — U-критерием Манна–Уитни. Оценку диагностической значимости биомаркеров проводили методом анализа ROC-кривых, рассчитывая значение площади под кривой (ППК) и пороговый уровень по индексу Юдена. Для разработки диагностических моделей применяли метод логистической регрессии. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

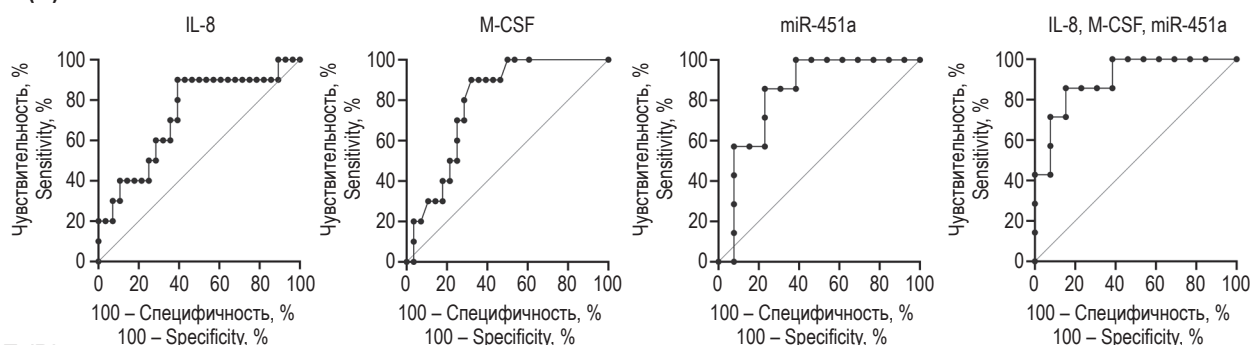
Результаты и обсуждение

Статистический анализ не выявил достоверных отличий по полу, гестационному возрасту, весу при рождении, оценке Апгар, пороку сердца и по стандартным лабораторным показателям между новорожденными с ВПС и новорожденными с ВПС + НЭК (табл. 1).

Анализ уровня 31 цитокина плазмы крови показал, что IL-1 β , IL-3, IL-22 и GM-CSF в более 80% образцов имели значения ниже определяемого уровня. Среди оставшихся 27 цитокинов только уровни IL-8 и M-CSF были статистически значимо выше в 1,6 ($p = 0,037$) и 12,6 ($p = 0,006$) раз соответственно, у новорожденных с ВПС + НЭК по сравнению с новорожденными с ВПС без НЭК (табл. 1).

IL-8 — провоспалительный хемокин, ключевая роль которого состоит в привлечении нейтрофилов в очаг воспаления [2]. M-CSF регулирует поляризацию макрофагов в сторону противовоспалительного фенотипа, а также стимулирует дифференцировку и созревание ворсинок кишечника, удлиняя их поверхность [3, 10]. Таким образом, можно предположить, что повышение уровня IL-8 у новорожденных с ВПС + НЭК может влиять на более активное привлечение нейтрофилов в очаг воспаления, формирование нейтрофильных ловушек и усиление воспалительного ответа; а высокий уровень M-CSF за счет стимуляции роста ворсинок кишечника может способствовать увеличению области воспаления. Повышение уровня IL-8 у недоношенных

А (А)



Б (В)

Параметр Parameter	Площадь под кривой Area under curve	95% Доверительный интервал 95% Confidence Interval	p	Пороговый уровень Cut-off	Чувствительность Sensitivity, %	Специфичность Specificity, %
IL-8	0,725	0,556-0,857	0,022	> 6,88	90,0	60,7
M-CSF	0,787	0,625-0,903	0,0001	> 33,29	90,0	67,9
miR-451a	0,835	0,604-0,961	0,0004	< 0,11	85,7	76,9
IL-8, miR-451a	0,890	0,670-0,984	< 0,0001	> 0,30	85,7	84,6
IL-8, M-CSF	0,793	0,631-0,907	0,0001	> 0,17	90,0	64,3
M-CSF, miR-451a	0,890	0,670-0,984	< 0,0001	> 0,36	85,7	84,6
IL-8, M-CSF, miR-451a	0,901	0,684-0,988	< 0,0001	> 0,33	85,7	84,6

Рисунок 1. ROC-анализ уровней IL-8, M-CSF, miR-451a и их комбинации у доношенных новорожденных с ВПС и ВПС + НЭК

Figure 1. ROC analysis of IL-8, M-CSF, miR-451a and their combination in the diagnosis of NEC in term newborns with CHD

ТАБЛИЦА 1. КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ДОНОШЕННЫХ НОВОРОЖДЕННЫХ С ДУКТУС-ЗАВИСИМЫМИ ВПС В ЗАВИСИМОСТИ ОТ РАЗВИТИЯ НЭК В ПОСЛЕОПЕРАЦИОННОМ ПЕРИОДЕ

TABLE 1. CLINICAL AND LABORATORY CHARACTERISTICS OF TERM NEWBORNS WITH DUCTUS-DEPENDENT CONGENITAL HEART DEFECTS DEPENDING ON THE NEC DEVELOPMENT IN THE POSTOPERATIVE PERIOD

Параметры / Parameters		ВПС / CHD (n = 28)	ВПС + НЭК / CHD + NEC (n = 10)	p
Клинические данные / Clinical data				
Пол Sex	Девочка (11) Girl (11)	10 (36%)	1 (10%)	0,225
	Мальчик (27) Boy (27)	18 (64%)	9 (90%)	
Гестационный возраст, недели (38) Gestational age, wk (38)		39 (38-40)	39 (38-39)	0,334
Вес при рождении, г (38) Birth weight, g (38)		3495 (3000-3815)	3235 (3020-3620)	0,334
Оценка по Апгар на 1-й минуте (38) Apgar score at the 1 st minute (38)		7 (7-7)	7 (7-7)	1,0
Оценка по Апгар на 5-й минуте (38) Apgar score at the 5 th minute (38)		8 (7-8)	8 (8-8)	0,286
Порок сердца Heart defect	Цианотический (25) Cyanotic (25)	18 (64%)	7 (70%)	1,0
	Ацианотический (13) Acyanotic (13)	10 (36%)	3 (30%)	
Лабораторные показатели / Laboratory parameters				
Гемоглобин, г/л Hemoglobin, g/L		134 (119-149)	123 (109-143)	0,334
Эритроциты, × 10 ¹² /л Erythrocytes, × 10 ¹² /L		4,3 (3,8-4,8)	4,0 (3,6-4,9)	0,482
Тромбоциты, × 10 ⁹ /л Platelets, × 10 ⁹ /L		325 (210-472)	302 (232-421)	0,660
Лейкоциты, × 10 ⁹ /л Leukocytes, × 10 ⁹ /L		12,8 (11,5-15,4)	11,3 (8,5-19,4)	0,613
Палочкоядерные нейтрофилы, % Band neutrophils, %		1,0 (0,5-3,0)	1,0 (1,0-2,0)	0,404
Сегментоядерные нейтрофилы, % Segmented neutrophils, %		56,5 (45,5-64,5)	50,0 (44,0-58,0)	0,442
Эозинофилы, % Eosinophils, %		3,0 (1,5-6,5)	5,0 (0,0-10,0)	0,935
Лимфоциты, % Lymphocytes, %		25,0 (16,0-32,0)	23,5 (14,0-30,0)	0,660
С-реактивный белок, мг/л C-reactive protein, mg/L		9,1 (5,5-19,7)	4,9 (2,8-18,0)	0,194
Иммунологические показатели / Immunological parameters				
IL-8, пг/мл IL-8, pg/mL		5,87 (4,39-10,06)	9,18 (7,36-20,51)	0,037
M-CSF, пг/мл M-CSF, pg/mL		5,71 (0,00-61,62)	71,71 (47,47-152,14)	0,006
miR-451a, у. е. miR-451a, c. u.		0,25 (0,12-0,55)	0,05 (0,02-0,11)	0,014

Примечание. Достоверность различий качественных переменных оценивали точным критерием Фишера, количественных – по U-критерию Манна–Уитни – p < 0,05

Note. The reliability of differences in qualitative variables was assessed using Fisher's exact test, and quantitative variables were assessed using the Mann–Whitney U test, p < 0.05.

новорожденных в раннем неонатальном периоде было также ассоциировано с риском развития НЭК [1].

Анализ уровня экспрессии микроРНК в образцах плазмы крови показал, что две группы новорожденных отличались друг от друга только по уровню экспрессии miR-451a, которая была в 5 раз ниже ($p = 0,014$) у новорожденных с НЭК (табл. 1).

MiR-451 является важнейшим регулятором многочисленных сигнальных путей, в том числе участвует в эритропоэзе и модулирует продукцию цитокинов дендритными клетками [9]. На мышинной модели ревматоидного артрита установлено, что повышенные уровни miR-451a ингибируют хемотаксис нейтрофилов [6]. На клетках микроглии доказано, что miR-451a оказывает противовоспалительные эффекты посредством ингибирования NLRP3-индуцированных провоспалительных каскадов [4]. Таким образом, можно предположить, что высокий уровень miR-451a снижает воспаление и может служить защитным механизмом против развития НЭК у доношенных новорожденных с ВПС.

Повышенный уровень miR-451 был обнаружен в тканях кишечника недоношенных новорожденных с НЭК [7]. Учитывая, что у недоношенных, кишечник функционально незрелый,

молекулярные механизмы НЭК у доношенных новорожденных с ВПС могут значительно отличаться от таковых у недоношенных новорожденных, а повышенные уровни miR-451, у недоношенных новорожденных, вероятно, связаны с продолжающимся формированием функционально зрелого кишечника.

С целью определения диагностической значимости идентифицированных биомаркеров был проведен ROC-анализ, с определением пороговых уровней и соответствующих им значений чувствительности и специфичности (рис. 1). Наибольшую диагностическую ценность продемонстрировала модель, включающая все 3 биомаркера (ППК = 0,901, с чувствительностью 85,7% и специфичностью 84,6%. Тогда как модель, включающая только цитокины IL-8 и M-CSF, имела уровень ППК = 0,793 с чувствительностью 90,0%, но низкой специфичностью – 64,3%.

Выводы

Модель, включающая три биомаркера miR-451a, IL-8 и M-CSF, обладает высоким диагностическим потенциалом (ППК = 0,901 с чувствительностью 85,7% и специфичностью 84,6%) для диагностики НЭК в рутинной клинической практике.

Список литературы / References

1. Никитина И.В., Ленюшкина А.А., Крог-Йенсен О.А., Пупышева А.Ф., Кречетова Л.В., Инвиева Е.В., Савельева Е.И., Зубков В.В., Дегтярев Д.Н., Байбарина Е.Н. Прогностическая значимость исследования уровня цитокинов плазмы крови в раннем неонатальном периоде в отношении некротизирующего энтероколита у недоношенных новорожденных // Неонатология: новости, мнения, обучение, 2024. Т. 12, № 4. С. 8-22. [Nikitina I.V., Lenyushkina A.A., Krogh-Jensen O.A., Pupysheva A.F., Krechetova L.V., Inviyaeva E.V., Savelyeva E.I., Zubkov V.V., Degtyarev D.N., Baybarina E.N. The value of plasma cytokines within the early neonatal period for predicting necrotizing enterocolitis in preterm infants. *Neonatologiya: novosti, mneniya, obuchenie* = *Neonatology: News, Opinions, Training*, 2024, Vol. 12, no. 4, pp. 8-22. (In Russ.)]
2. Akdis M., Burgler S., Cramer R., Eiwegger T., Fujita H., Gomez E., Klunker S., Meyer N., O'Mahony L., Palomares O., Rhyner C., Quaked N., Schaffartzik A., Van De Veen W., Zeller S., Zimmermann M., Akdis C.A. Interleukins, from 1 to 37, and interferon- γ : Receptors, functions, and roles in diseases. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2011, Vol. 127, no. 3, pp. 701-721.
3. Douglass T.G., Driggers L., Zhang J.G., Hoa N., Delgado C., Williams C.C., Dan Q., Sanchez R., Jeffes E.W.B., Wepsic H.T., Myers M.P., Koths K., Jadus M.R. Macrophage colony stimulating factor: Not just for macrophages anymore! A gateway into complex biologies. *Int. Immunopharmacol.*, 2008, Vol. 8, no. 10, pp. 1354-1376.
4. Hong Z., Cheng J., Ye Y., Chen X., Zhang F. MicroRNA-451 Attenuates the inflammatory response of activated microglia by downregulating nucleotide binding oligomerization domain-like receptor protein 3. *World Neurosurg.*, 2022, Vol. 167, pp. e1128-e1137.
5. Lau P.E., Cruz S.M., Ocampo E.C., Nuthakki S., Style C.C., Lee T.C., Wesson D.E., Olutoye O.O. Necrotizing enterocolitis in patients with congenital heart disease: A single center experience. *J. Pediatr. Surg.*, 2018, Vol. 53, no. 5, pp. 914-917.
6. Murata K., Yoshitomi H., Furu M., Ishikawa M., Shibuya H., Ito H., Matsuda S. MicroRNA-451 down-regulates neutrophil chemotaxis via p38 MAPK. *Arthritis Rheumatol.*, 2014, Vol. 66, no. 3, pp. 549-559.
7. Ng P.C., Chan K.Y.Y., Leung K.T., Tam Y.H., Ma T.P.Y., Lam H.S., Cheung H.M., Lee K.H., To K.F., Li K. Comparative MiRNA expression profiles and molecular networks in human small bowel tissues of necrotizing

enterocolitis and spontaneous intestinal perforation. *PLoS One*, 2015, Vol. 10, no. 8, e0135737. doi: 10.1371/journal.pone.0135737.

8. Petrova T., Kalinina O., Aquino A., Grigoryev E., Dubashynskaya N., Zubkova K., Kostareva A., Golovkin A. Topographic Distribution of miRNAs (miR-30a, miR-223, miR-let-7a, miR-let-7f, miR-451, and miR-486) in the Plasma Extracellular Vesicles. *Noncoding RNA*, 2024, Vol. 10, no. 1, 15. doi: 10.3390/ncrna10010015.

9. Rosenberger C.M., Podyminogin R.L., Navarro G., Zhao G.W., Askovich P.S., Weiss M.J., Aderem A. miR-451 regulates dendritic cell cytokine responses to influenza infection. *J. Immunol.*, 2012, Vol. 189, no. 12, pp. 5965-5975.

10. Ushach I., Zlotnik A. Biological role of granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) on cells of the myeloid lineage. *J. Leukoc. Biol.*, 2016, Vol. 100, no. 3, pp. 481-489.

11. van der Heide M., Mebius M.J., Bos A.F., Roofthoof M.T.R., Berger R.M.F., Hulscher J.B.F., Kooi E.M.W. Hypoxic/ischemic hits predispose to necrotizing enterocolitis in (near) term infants with congenital heart disease: a case control study. *BMC Pediatr.*, 2020, Vol. 20, no. 1, 553. doi: 10.1186/s12887-020-02446-6.

Авторы:

Зайкова Е.К. — младший научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории микровезикулярного сигналинга Института молекулярной биологии и генетики ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Каплина А.В. — младший научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории физиологии и патологии новорожденных Института перинатологии и педиатрии, врач-неонатолог отделения физиологии новорожденных с палатой интенсивной терапии Клиники материнства и детства ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Петрова Н.А. — к.м.н., доцент, заведующая научно-исследовательской лабораторией физиологии и патологии новорожденных Института перинатологии и педиатрии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Authors:

Zaikova E.K., Junior Researcher, Research Laboratory of Microvesicular Signaling, Institute of Molecular Biology and Genetics, V. Almazov National Medical Research Centre, St. Petersburg, Russian Federation

Kaplina A.V., Junior Researcher, Research Laboratory of Physiology and Pathology of Newborns, Institute of Perinatology and Pediatrics; Neonatologist, Department of Physiology of Newborns with Intensive Care Unit, Clinic of Maternity and Childhood, V. Almazov National Medical Research Centre, St. Petersburg, Russian Federation

Petrova N.A., PhD (Medicine), Associate Professor, Head, Research Laboratory of Physiology and Pathology of Newborns, Institute of Perinatology and Pediatrics, V. Almazov National Medical Research Centre, St. Petersburg, Russian Federation

Первунина Т.М. — д.м.н., профессор, директор Института перинатологии и педиатрии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Костарева А.А. — д.м.н., профессор кафедры факультетской терапии с клиникой Института медицинского образования, директор Института молекулярной биологии и генетики ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Калинина О.В. — д.б.н., профессор кафедры лабораторной медицины с клиникой Института медицинского образования, ведущий научный сотрудник Института молекулярной биологии и генетики ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова» Министерства здравоохранения РФ; ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной эпидемиологии и эволюционной генетики ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера», Санкт-Петербург, Россия

Pervunina T.M., PhD, MD (Medicine), Professor, Director, Institute of Perinatology and Pediatrics, V. Almazov National Medical Research Centre, St. Petersburg, Russian Federation

Kostareva A.A., PhD, MD (Medicine), Professor of the Department of Faculty Therapy with a Clinic of the Institute of Medical Education, Director of the Institute of Molecular Biology and Genetics, V. Almazov National Medical Research Centre, St. Petersburg, Russian Federation

Kalinina O.V., PhD, MD (Biology), Professor of the Department of Laboratory Medicine with a Clinic of the Institute of Medical Education, Leading Researcher of the Institute of Molecular Biology and Genetics, V. Almazov National Medical Research Centre; Leading Researcher, Laboratory of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics, Saint Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation

Поступила 29.03.2025
Отправлена на доработку 08.04.2025
Принята к печати 25.05.2025

Received 29.03.2025
Revision received 08.04.2025
Accepted 25.05.2025

ИЗУЧЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ЦИТОКИНОВ И ХЕМОКИНОВ ПРИ ОЛИГОМЕНОРЕЕ У ДЕВОЧЕК-ПОДРОСТКОВ С ОЖИРЕНИЕМ

Левкович М.А., Андреева В.О., Крукиер И.И., Авруцкая В.В.,
Ермолова Н.В., Кравченко Л.В.

ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ,
г. Ростов-на-Дону, Россия

Резюме. Последние десятилетия характеризуются ростом ожирения среди детей и подростков, которое является основным фактором риска хронических заболеваний, включая сердечно-сосудистые, сахарный диабет, а также эндокринопатии, приводящие к нарушению менструального цикла и бесплодию в репродуктивном периоде. В условиях избытка питательных веществ макрофаги жировой ткани поляризуются в М1-фенотип и секретируют множество провоспалительных цитокинов и хемокинов, формирующих воспалительную реакцию за счет хемотаксиса иммунокомпетентных клеток, оказывающих воздействие на обмен веществ, приводя к снижению продукции противовоспалительных цитокинов, нарушению адипогенеза. Доказана тесная связь между ожирением и активацией факторов иммунной системы, как основной причины энергетического дисбаланса, однако их роль в генезе олигоменореи недостаточно изучена. Цель работы – анализ цитокинового статуса у девочек-подростков с ожирением и олигоменореей. В исследовании приняли участие 30 девочек-подростков с ожирением и олигоменореей (I группа). С целью сравнительной оценки было обследовано 23 пациентки с олигоменореей без признаков метаболического синдрома (II группа). В группу контроля вошли 20 практически здоровых пациенток. Уровень оментина в сыворотке крови определялся методом ИФА с использованием диагностических наборов BioVendor (Чешская Республика), уровень IL-6, MCP-1, IFN γ – BenderMedSystems (Австрия). Математическая обработка результатов исследования проводилась с использованием программы Statistica 10.0. Критерий Манна–Уитни использовался для определения различий между группами. Статистически значимыми были приняты значения $p < 0,05$. При ожирении происходит усиление экспрессии провоспалительных цитокинов и хемокинов, которые могут стимулировать сигнальные каскады, нарушающие процессы метаболизма жировой ткани. IL-6, MCP-1, IFN γ действуют как модуляторы, которые способствуют воспалению, что имеет решающее значение для возникновения резистентности к инсулину. Дискоординация процессов иммунорегуляции содействует прогрессированию воспалительного процесса и подтверждает роль иммунных факторов в генезе овариальной дисфункции у девочек-подростков. Лучшее пони-

Адрес для переписки:

Левкович Марина Аркадьевна
ФГБОУ ВО «Ростовский государственный
медицинский университет» Министерства
здравоохранения РФ
344012, Россия, г. Ростов-на-Дону,
ул. Мечникова, 43.
Тел.: 8 (918) 570-64-36.
E-mail: xlma@mail.ru

Address for correspondence:

Marina A. Levkovich
Rostov State Medical University
43 Mechnikov St
Rostov-on-Don
344012 Russian Federation
Phone: +7 (918) 570-64-36.
E-mail: xlma@mail.ru

Образец цитирования:

М.А. Левкович, В.О. Андреева, И.И. Крукиер,
В.В. Авруцкая, Н.В. Ермолова, Л.В. Кравченко
«Изучение содержания цитокинов и хемокинов
при олигоменорее у девочек-подростков с ожирением»
// Российский иммунологический журнал, 2025. Т. 28,
№ 3. С. 619-624.
doi: 10.46235/1028-7221-17114-SOC

© Левкович М.А. и соавт., 2025

Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

M.A. Levkovich, V.O. Andreeva, I.I. Krukier, V.V. Avrutskaya,
N.V. Ermolova, L.V. Kravchenko "Study of cytokine and
chemokine levels in oligomenorrhea in obese adolescent girls",
Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii
Zhurnal, 2025, Vol. 28, no. 3, pp. 619-624.
doi: 10.46235/1028-7221-17114-SOC

© Levkovich M.A. et al., 2025

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

DOI: 10.46235/1028-7221-17114-SOC

мания основных иммунопатологических процессов, сопровождающих ожирение у девочек-подростков, может оказаться полезным для прогнозирования олигоменореи и разработки потенциальных подходов к лечению.

Ключевые слова: девочки-подростки, провоспалительные цитокины, хемокины, ожирение, олигоменорея

STUDY OF CYTOKINE AND CHEMOKINE LEVELS IN OLIGOMENORRHEA IN OBESE ADOLESCENT GIRLS

Levkovich M.A., Andreeva V.O., Krukier I.I., Avrutskaya V.V., Ermolova N.V., Kravchenko L.V.

Rostov State Medical University, Rostov-on-Don, Russian Federation

Abstract. Over last decades, growing incidence of obesity is registered among children and adolescents, which is the main risk factor for chronic diseases, including cardiovascular disorders, diabetes mellitus, and endocrinopathies which lead to menstrual irregularities and infertility in reproductive period. Under conditions of overnutrition, adipose tissue macrophages are polarized into the M1 phenotype and secrete a number of proinflammatory cytokines and chemokines that promote inflammatory response due to chemotaxis of immunocompetent cells that affect metabolism, thus leading to decreased production of anti-inflammatory cytokines, and causing impaired adipogenesis. A close relationship has been observed between obesity and activation of immune system factors, being a sufficient factor of energy imbalance. However, their role in the genesis of oligomenorrhea has not been studied so far. The purpose of our work was analysis of cytokine status in adolescent girls with obesity and oligomenorrhea. The study involved 30 adolescent girls with obesity and oligomenorrhea (Group I). A comparison group included 23 patients with oligomenorrhea without signs of metabolic syndrome (Group II). The control group included 20 practically healthy patients. The level of omentin in blood serum was determined by ELISA using diagnostic kits BioVendor (Czech Republic); the level of IL-6, MCP-1, IFN γ was measured with diagnostic kits from BenderMedSystems (Austria). Mathematical evaluation of results was carried out using the Statistica 10.0 program. The Mann–Whitney criterion was used to determine the differences between the groups. Statistically significant values were taken as $p < 0.05$. Obesity is associated with increased expression of proinflammatory cytokines and chemokines, which may stimulate signaling cascades that impair metabolic processes in adipose tissue. IL-6, MCP-1, IFN γ act as modulators that promote inflammation, which is crucial for the development of insulin resistance conditions. Discoordination of immunoregulatory processes, contribute to progression of the inflammatory events and confirm the role of immune factors in the genesis of ovarian dysfunction in adolescent girls. Improved understanding of underlying immunopathological processes accompanying obesity in adolescent girls may be useful for predicting oligomenorrhea and developing potential treatment approaches.

Keywords: adolescent girls, proinflammatory cytokines, chemokines, obesity, oligomenorrhea

Введение

Последние десятилетия характеризуются ростом ожирения среди детей и подростков, которое является основным фактором риска хронических заболеваний, включая сердечно-сосудистые, сахарный диабет, а также эндокринопатии, приводящие к нарушению менструального цикла и бесплодию в репродуктивном периоде [2, 8, 13]. В настоящее время доказана тесная связь между ожирением и активацией факторов иммунной системы, как основной причины энергетического дисбаланса в большинстве органов [12]. В условиях избытка питательных веществ макрофаги

жировой ткани поляризуются в M1-фенотип и секретируют множество провоспалительных цитокинов и хемокинов [6], формирующих воспалительную реакцию за счет хемотаксиса иммунных клеток, оказывающих воздействие на обмен веществ, приводя к снижению продукции противовоспалительных цитокинов, нарушению адипогенеза [1, 16, 17].

Расстройство иммунорегуляции при ожирении приводит к хроническому воспалению, характеризующемуся повышенной инфильтрацией и активацией клеток врожденной и адаптивной иммунной системы, формированию инсулинорезистентности за счет ингибирования сигнальных

путей инсулина [4, 14, 20]. Инсулинорезистентность обеспечивает митогенную стимуляцию клеток яичников, снижает уровень глобулина, связывающего половые гормоны, что может привести к повышению уровня свободных андрогенов, клинической гиперандрогении и нарушению менструальной функции [18].

Несмотря на проводимые исследования, процессы, приводящие к нарушению менструальной функции у девочек-подростков с ожирением, остаются мало исследованными. В этой связи актуальным является изучение роли иммунных факторов, принимающих участие в дисфункции яичников при ожирении.

Цель работы — анализ цитокинового статуса у девочек-подростков с ожирением и олигоменореей.

Материалы и методы

Было обследовано 30 девочек-подростков с ожирением и олигоменореей (I группа). С целью сравнительной оценки было обследовано 23 пациентки с олигоменореей без признаков метаболического синдрома (II группа). В группу контроля вошли 20 практически здоровых пациенток. Уровень оментина в сыворотке крови определялся методом ИФА с использованием тест-систем BioVendor (Чешская Республика), уровень IL-6, MCP-1, IFN γ с использованием тест-систем BenderMedSystems (Австрия). Математическая обработка результатов исследования проводилась с использованием программы Statistica 10.0. Критерий Манна–Уитни использовался для определения различий между группами. Статистически значимыми были приняты значения $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Оментин-1 секретируется жировой тканью и играет важную роль в регуляции метаболизма глюкозы, ассоциированного с избыточной массой тела, а также может иметь атеропротективное, противовоспалительное действие, влиять на чувствительность к инсулину [5].

Изучение количественных показателей оментина в группах пациенток с олигоменореей выявило снижение его уровня в сыворотке крови, однако статистические различия были отмечены только между показателями I и контрольной группой ($p < 0,05$) (табл. 1).

Взаимоотношения между ожирением и инсулинорезистентностью связаны с воспалительными, нервными и эндокринными путями, которые влияют на чувствительность органов к уровню инсулина в организме.

Избыток насыщенных жирных кислот при ожирении может стимулировать воспаление, опосредованное цитокинами и хемокинами, которые вызывают резистентность к инсулину. Хемокины усугубляют симптомы ожирения, привлекая иммунные клетки, которые продуцируют провоспалительные цитокины, а также супероксид, тем самым способствуя воспалительной реакции и влияя на метаболические пути.

MCP-1 синтезируется в ответ на действие провоспалительных цитокинов и жирных кислот, что еще более усиливает воспалительную реакцию, способствуя развитию осложнений, связанных с ожирением [15]. При изучении содержания MCP-1 отмечено повышение его уровня в сыворотке крови у пациентов I группы, по сравнению с контрольной и II группой ($p < 0,05$) (табл. 1).

ТАБЛИЦА 1. ПОКАЗАТЕЛИ ОМЕНТИНА, MCP-1, IL-6, IFN γ У ПАЦИЕНТОК ИССЛЕДУЕМЫХ ГРУПП

TABLE 1. INDICATORS OF OMENTIN, MCP-1, IL-6, IFN γ IN PATIENTS OF THE STUDY GROUPS

Показатели Indicators	I группа Group I	II группа Group II	Контроль Control
Оментин, нг/мл (сыворотка крови) Omentin, ng/mL (blood serum)	180,2 (170,1-182,4)*	200 (191,1-210,3)	350 (340,2-365,2)
MCP-1, пг/мл (сыворотка крови) MCP-1, pg/mL (blood serum)	260 (240,3-277,1)*.*	110 (101,7-125,6)	80 (77,1-90,4)
IL-6, пг/мл (сыворотка крови) IL-6, pg/mL (blood serum)	104,6 (92,3-110,2)*.*	72,2 (68,6-104,5)*	19,4 (16,4-26,7)
IFN γ , пг/мл (сыворотка крови) IFN γ , pg/mL (blood serum)	78,2 (60,1-88,2)*.*	49,5 (30,4-59,1)	26,4 (19,4-35,3)

Примечание. * — статистически значимые различия с контрольной группой ($p < 0,05$); *.* — статистически значимые различия между I и II группой ($p < 0,05$).

Note. *, statistically significant differences with the control group ($p < 0.05$); *.* , statistically significant differences between groups I and II ($p < 0.05$).

Провоспалительные цитокины — сигнальные молекулы, вовлеченные в модуляцию реакций воспаления, стимулирующие ось «гипоталамус — гипофиз — надпочечники», приводящие к повышению секреции кортизола, инсулинорезистентности, расстройству липидного обмена, и гемостазиологических механизмов.

IL-6 — цитокин, синтезируемый в том числе и клетками жировой ткани, оказывает свое основное действие посредством связывания с мембраносвязанным α -рецептором (IL-6R). Повышенные уровни IL-6 при ожирении потенцируют риск сердечно-сосудистых осложнений, резистентности к инсулину [9]. Анализ IL-6 выявил значительное возрастание его уровня у пациенток с олигоменореей по сравнению с контролем ($p < 0,05$), можно отметить, что при олигоменорее и ожирении показатели были значимо выше, что подтверждает роль IL-6 в процессах воспаления при ожирении.

IFN γ — Th1-цитокин, имеющий важное значение для поляризации макрофагов в M1-фенотип, активации CD8 $^{+}$ лимфоцитов, а также подавления Treg при ожирении. Данные изменения могут приводить к нарушению метаболизма адипоцитов и инсулинорезистентности [1]. IFN γ вызывает образование оксида азота, следствием чего может явиться нарушение секреции инсулина. В нашей работе выявлено статистически значимое повышение уровня IFN γ в I группе по сравнению с контрольной и II группой (табл. 1).

При ожирении происходит усиление экспрессии провоспалительных цитокинов и хемокинов, которые могут стимулировать сигнальные каскады, нарушающие процессы метаболизма жировой ткани, содействуют прогрессированию воспалительного процесса и дисфункции яичников.

Результатом нашего исследования явилось расширение представлений о патогенетических механизмах олигоменореи у девочек-подростков с ожирением, которые дают возможность понимания того, что процесс характеризуется нарушением иммунной регуляции. При ожирении провоспалительные цитокины и хемокины действуют как модуляторы, которые способствуют воспалению, что имеет решающее значение для возникновения резистентности к инсулину и метаболической дисфункции.

Оментин-1 секретируется висцеральной жировой тканью, участвует в регуляции обменных процессов. Редукция уровня оментина-1, зарегистрированная у пациенток с олигоменореей

и ожирением, согласуется с данными авторов, сообщивших об уменьшении количества оментина-1 при дисметаболических состояниях, и свидетельствует об его участии в регуляции основных функций клеток яичников [19].

МСП-1 — хемокин, который обладает сильной хемотаксической активностью по отношению к иммунным клеткам, синтезирующих провоспалительные цитокины, а также супероксид, что дополнительно способствует воспалительному процессу. Отличительной особенностью пациенток с ожирением и олигоменореей является возрастание содержания уровня МСП-1 в сыворотке крови, что не противоречит мнению [11] о его роли в развитии олигоменореи при ожирении.

IL-6 — играет важную роль в формировании противоинфекционного ответа, активируя иммунные клетки, кроме того, действует на ключевые участки метаболической регуляции во многих тканях, стимулируя белки-супрессоры (SOCS), которые оказывают отрицательное влияние на действие инсулина. Полученные нами результаты об увеличении количества IL-6 у пациенток с ожирением и олигоменореей, согласуются с выводами авторов [10], продемонстрировавших, что ожирение является триггером экспрессии IL-6, способствуя формированию метаболического воспаления и развитию инсулинорезистентности.

Интерфероны представляют собой большое семейство плейотропных цитокинов, которые играют ключевую роль в противовирусной защите, а также участвуют в патогенезе ожирения и связанных с ним осложнениях.

Анализ показал, что в группе пациенток с ожирением и олигоменореей регистрируется повышение уровня IFN γ , что служит отражением выраженности воспалительной реакции [7].

Выводы

Под воздействием ожирения происходит повышение синтеза провоспалительных факторов, потенцирующих развитие метаболических нарушений и гиперинсулинемии, модуляция функции нейроэндокринной оси, следствием чего является повышение количества андрогенов и нарушение процессов овуляции. Улучшение понимания основных иммунопатологических процессов, сопровождающих ожирение, может оказаться полезным для прогнозирования олигоменореи у девочек-подростков, а также для разработки потенциальных подходов к лечению.

Список литературы / References

1. Андреева В.О., Линде В.А., Левкович М.А., Билим М.В., Машталова А.А., Мирошниченко В.Г. Роль адипоцитокинов в генезе овариальной дисфункции при ожирении у девочек-подростков // Репродуктивное здоровье детей и подростков, 2014. № 3. С. 51-60. [Andreeva V.O., Linde V.A., Levkovich M.A., Bilim M.V.,

Mashtalova A.A., Miroshnichenko V.G. The role of adipocytokines in the genesis of ovarian dysfunction in obesity in adolescent girls. *Reproduktivnoe zdorovye detey i podrostkov = Reproductive Health of Children and Adolescents*, 2014, no. 3, pp. 51-60. (In Russ.)]

2. Волкова Н.И., Дегтярева Ю.С. Механизмы нарушения фертильности у женщин с ожирением // Медицинский вестник Юга России, 2020. Т. 11, № 3. С. 15-19. [Volkova N.I., Degtyareva Yu.S. Mechanisms of impaired fertility in women with obesity. *Meditsinskiy vestnik Yuga Rossii = Medical Bulletin of the South of Russia*, 2020, Vol. 11, no. 3, pp. 15-19. (In Russ.)]

3. Купина А.Д., Петров Ю.А., Шаталов А.Е. Особенности развития репродуктивных нарушений у женщин с аутоиммунным тиреоидитом // Современные проблемы науки и образования, 2020. № 1. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=29424>. [Kupina A.D., Petrov Yu.A., Shatalov A.E. Features of the development of reproductive disorders in women with autoimmune thyroiditis. *Sovremennyye problemy nauki i obrazovaniya = Modern Problems of Science and Education*, 2020, no. 1. [Electronic resource]. Available at: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=29424>. (In Russ.)]

4. Левкович М.А., Андреева В.О., Хошаби К.Э. Роль Толл-подобных рецепторов и полиморфизма их генов в патогенезе овариальной дисфункции у девочек-подростков с ожирением // Репродуктивное здоровье детей и подростков, 2020. Т. 16, № 3 (88). С. 64-72. [Levkovich M.A., Andreeva V.O., Khoshabi K.E. The role of Toll-like receptors and their gene polymorphism in the pathogenesis of ovarian dysfunction in adolescent girls with obesity. *Reproduktivnoe zdorovye detey i podrostkov = Reproductive Health of Children and Adolescents*, 2020, Vol. 16, no. 3 (88), pp. 64-72. (In Russ.)]

5. Маркова Т.Н., Мищенко Н.К., Петина Д.В. Адипоцитокины: современный взгляд на дефиницию, классификацию и роль в организме // Проблемы Эндокринологии, 2022. Т. 68, № 1. С. 73-80. [Markova T.N., Mishchenko N.K., Petina D.V. Adipocytokines: a modern view on the definition, classification and role in the body. *Problemy Endokrinologii = Problems of Endocrinology*, 2022, Vol. 68, no. 1, pp. 73-80. (In Russ.)]

6. Ahmed B., Sultana R., Greene M.W. Adipose tissue and insulin resistance in obese. *Biomed. Pharmacother.*, 2021, Vol. 13, 111315. doi: 0.1016/j.biopha.2021.111315.

7. Bradley D., Smith A.J., Blaszcak A., Shantaram D., Bergin S.M., Jalilvand A., Wright V., Wyne K.L., Dewal R.S., Baer L.A., Wright K.R., Stanford K.I., Needleman B., Brethauer S., Noria S., Renton D., Joseph J.J., Lovett-Racke A., Liu J., Hsueh W.A. Interferon gamma mediates the reduction of adipose tissue regulatory T cells in human obesity. *Nat. Commun.*, 2022, Vol. 13, no. 1, 5606. doi: 10.1038/s41467-022-33067-5.

8. Di Fusco S.A., Mocini E., Gulizia M.M., Gabrielli D., Grimaldi M., Oliva F., Colivicchi F. ANMCO (Italian Association of Hospital Cardiologists) scientific statement: obesity in adults-an approach for cardiologists. *Eat. Weight Disord.*, 2024, Vol. 29, no. 1, 1. doi: 10.1007/s40519-023-01630-8.

9. El-Mikkawy D., EL-Sadek M.A., EL-Badawy M.A., Samaha D. Circulating level of interleukin-6 in relation to body mass indices and lipid profile in Egyptian adults with overweight and obesity. *Egypt. Rheumatol. Rehabil.*, 2020, Vol. 47, no. 1, 7. doi: 10.1186/s43166-020-00003-8.

10. Gálvez I., Navarro M.C., Martín-Cordero L., Otero E., Hinchado M.D., Ortega E. The influence of obesity and weight loss on the bioregulation of innate/inflammatory responses: macrophages and immunometabolism. *Nutrients*, 2022, Vol. 14, no. 3, 612. doi: 10.3390/nu14030612.

11. Hashimoto H., Eto T., Kawai K., Akimoto T. Expression of MCP-1 in white adipose tissues induce the resistin-hypersecretion in type 2 diabetes. *Obes. Med.*, 2020, Vol. 20, Suppl. 1, 100286. doi: 10.1016/j.obmed.2020.100286.

12. Hildebrandt X., Ibrahim M., Peltzer N. Cell death and inflammation during obesity: "Know my methods, WAT(son)". *Cell Death Differ.*, 2023, Vol. 30, no. 2, pp. 279-292.

13. Huang L.-Y., Chiu C.-J., Hsing C.-H., Hsu Y.-H. Interferon Family Cytokines in Obesity and Insulin Sensitivity. *Cells*, 2022, Vol. 11, no. 24, 4041. doi: 10.3390/cells11244041.

14. Kochumon S., Madhoun A.A., Al-Rashed F., Azim R., Al-Ozairi E., Al-Mulla F., Ahmad R. TherAdv. Adipose tissue gene expression of CXCL10 and CXCL11 modulates inflammatory markers in obesity: implications for metabolic inflammation and insulin resistance. *Endocrinol. Metab.*, 2020, Vol. 11, 2042018820930902. doi: 10.1177/2042018820930902.

15. Kostopoulou E., Kalavrizioti D., Davoulou P., Papachristou E. Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1), Activin-A and clusterin in children and adolescents with obesity or Type-1 diabetes mellitus. *Diagnostic*, 2024, Vol. 14, no. 4, 450. doi: 10.3390/diagnostics14040450.

16. Pellegrinelli V., Carobbio S., Vidal-Puig A. Adipose tissue plasticity: how fat depots respond differently to pathophysiological cues. *Diabetologia*, 2016, Vol. 59, pp. 1075-1088.

17. Rabinovich A., Cohen J.M., Cushman M., Wells P.S., Rodger M.A., Kovacs M.J., Anderson D.R., Tagalakakis V., Lazo-Langner A., Solymoss S., Miron M.J., Yeo E., Smith R., Schulman S., Kassis J., Kearon C., Chagnon I., Wong T., Demers C., Hanmiah R., Kaatz S., Selby R., Rathbun S., Desmarais S., Opatrny L., Ortel T.L., Ginsberg J.S., Kahn S.R. Inflammation markers and their trajectories after deep vein thrombosis in relation to risk of post-thrombotic syndrome. *J. Thromb. Haemost.*, 2015, Vol. 13, no. 3, pp. 398-408.

18. Reid S.P., Kao C.-N., Pasch L., Shinkai K., Cedars M.I., Huddleston H.G. Ovarian morphology is associated with insulin resistance in women with polycystic ovary syndrome: a cross sectional study. *Fertil. Res. Pract.*, 2017, Vol. 30, no. 3, 8. doi: 10.1186/s40738-017-0035-z.
19. Sirotkin A.V., Fabová Z., Loncová B., Bauerová M., Halim Harrath A. The adipokinesprogranulin and omentin – novel regulators of basic ovarian cell functions. *Reprod. Biol. Endocrinol.*, 2024, Vol. 22, no. 1, 38. doi: 10.1186/s12958-024-01215-9.
20. Wu H., Ballantyne C.M. Metabolic inflammation and insulin resistance in obesity. *Circ Res.*, 2020, Vol. 126, no. 11, pp. 1549-1564.

Авторы:

Левкович М.А. — д.м.н., доцент, ведущий научный сотрудник научного отдела клиники Научно-исследовательского института акушерства и педиатрии ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Ростов-на-Дону, Россия

Андреева В.О. — д.м.н., профессор, руководитель научного отдела клиники Научно-исследовательского института акушерства и педиатрии ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Ростов-на-Дону, Россия

Крукиер И.И. — д.б.н., ведущий научный сотрудник научного отдела клиники Научно-исследовательского института акушерства и педиатрии, профессор кафедры биохимии № 1 ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Ростов-на-Дону, Россия

Авруцкая В.В. — д.м.н., профессор, профессор кафедры акушерства и гинекологии № 2 ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Ростов-на-Дону, Россия

Ермолова Н.В. — д.м.н., доцент, главный научный сотрудник научного отдела клиники Научно-исследовательского института акушерства и педиатрии, профессор кафедры акушерства и гинекологии № 1 ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Ростов-на-Дону, Россия

Кравченко Л.В. — д.м.н., ведущий научный сотрудник научного отдела клиники Научно-исследовательского института акушерства и педиатрии, профессор кафедры пропедевтики детских болезней ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Ростов-на-Дону, Россия

Authors:

Levkovich M.A., PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Leading Researcher, Clinical Research Department, Research Institute of Obstetrics and Pediatrics, Rostov State Medical University, Rostov-on-Don, Russian Federation

Andreeva V.O., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Clinical Research Department, Research Institute of Obstetrics and Pediatrics, Rostov State Medical University, Rostov-on-Don, Russian Federation

Krukier I.I., PhD, MD (Biology), Leading Researcher, Clinical Research Department, Research Institute of Obstetrics and Pediatrics; Professor, Department of Biochemistry No. 1, Rostov State Medical University, Rostov-on-Don, Russian Federation

Avrutskaya V.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Obstetrics and Gynecology No. 2, Rostov State Medical University, Rostov-on-Don, Russian Federation

Ermolova N.V., PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Chief Researcher, Clinical Research Department, Research Institute of Obstetrics and Pediatrics; Professor, Department of Obstetrics and Gynecology No. 1, Rostov State Medical University, Rostov-on-Don, Russian Federation

Kravchenko L.V., PhD, MD (Medicine), Leading Researcher, Clinical Research Department, Research Institute of Obstetrics and Pediatrics; Professor, Department of Propaedeutics of Childhood Diseases, Rostov State Medical University, Rostov-on-Don, Russian Federation

Поступила 14.03.2025
Отправлена на доработку 09.05.2025
Принята к печати 25.05.2025

Received 14.03.2025
Revision received 09.05.2025
Accepted 25.05.2025

РЕАЛИЗАЦИЯ АДАПТИВНОГО ИММУННОГО ОТВЕТА ПЛАЗМАТИЧЕСКИМИ КЛЕТКАМИ НА ЭТАПАХ ФОРМИРОВАНИЯ ПОЛИПОЗНОГО РИНОСИНУСИТА

Ленгина М.А., Коркмазов А.М., Казачков Е.Л., Медведева Ю.А.

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

Резюме. Выделение фенотипов/эндотипов в механизмах формирования полипозного риносинусита позволили понять многие аспекты патофизиологических механизмов ремоделирования слизистых оболочек полости носа и околоносовых пазух, оптимизировать выбор эффективной тактики лечения пациентов. Вместе с тем, как показывают авторитетные литературные источники, сохраняется тенденция к росту заболеваемости людей полипозным риносинуситом, наблюдаются частые рецидивы сопровождающийся значительным снижением качества жизни. В связи с этим актуальным остаются вопросы поиска маркеров эндотипирования полипозного риносинусита, способных в ранние сроки позволить назначить патогенетическое лечение пациенту, и обеспечить прогноз болезни. Цель — проанализировать относительную плотность иммунокомпетентных клеток лимфоцитарного ряда с морфометрическим подтверждением у пациентов полипозного риносинусита с иммунным Т2-воспалением. Исследование проведено с участием 22 пациентов с верифицированным диагнозом полипозного риносинусита, госпитализированных для выполнения планового хирургического вмешательства. Все пациенты были разделены на основную группу — эндотип Т2 полипозного риносинусита и контрольную группу — эндотип Не-Т2 полипозного риносинусита. Проанализированы анамнестические, клиничко-лабораторные данные и морфометрические критерии обеих групп. У пациентов основной группы прослеживалась тенденция к четкому повышению уровня абсолютного количества эозинофилов в крови и варьировала от 320 до 1512 клеток/мкл. Анализ анамнестических данных позволил выявить у пациентов основной группы повышение частоты реопераций 21,4% в сравнении контрольной группой 12,5%. Высокий стаж заболевания 29 лет и длительный рецидив до 27,5 года отмечен в контрольной группе, в то время как в основной группе на фоне менее длительного течения полипозного риносинусита 18,2 года, продолжительность рецидива была более чем в 4 раза короче в сравнении временным периодом рецидивов в контрольной группе и составляла всего 6 лет. Морфометрически во взятой интраоперационно ткани полипа установлено, что относительная

Адрес для переписки:

Коркмазов Арсен Мусосович
ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный
медицинский университет» Министерства
здравоохранения РФ
454092, Россия, г. Челябинск, ул. Воровского, 64.
Тел.: 8 (932) 010-00-06.
E-mail: Korkmazov74@gmail.com

Address for correspondence:

Arsen M. Korkmazov
South Ural State Medical University
64 Vorovsky St
Chelyabinsk
454092 Russian Federation
Phone: +7 (932) 010-00-06.
E-mail: Korkmazov74@gmail.com

Образец цитирования:

М.А. Ленгина, А.М. Коркмазов, Е.Л. Казачков,
Ю.А. Медведева «Реализация адаптивного
иммунного ответа плазматическими клетками на
этапах формирования полипозного риносинусита»
// Российский иммунологический журнал, 2025. Т. 28,
№ 3. С. 625-630.

doi: 10.46235/1028-7221-17179-FOA

© Ленгина М.А. и соавт., 2025

Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

M.A. Lengina, A.M. Korkmazov, E.L. Kazachkov,
Yu.A. Medvedeva "Features of adaptive plasma cell immune
response at different stages of polypous rhinosinusitis", Russian
Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii
Zhurnal, 2025, Vol. 28, no. 3, pp. 625-630.
doi: 10.46235/1028-7221-17179-FOA

© Lengina M.A. et al., 2025

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

DOI: 10.46235/1028-7221-17179-FOA

плотность плазмоцитов в воспалительном инфильтрате стромы полипов у пациентов основной группы была выше, чем группе контроля и составляла 0,06 и 0,04 клеток в 1 мм² соответственно. Поиск патогенетических маркеров морфометрических особенностей и иммунологических аспектов формирования специфического иммунного ответа у пациентов с полипозным риносинуситом позволит назначать эффективное лечение пациенту и прогнозировать исход болезни.

Ключевые слова: полипозный риносинусит, эндотип, иммунитет, цитокины, плазмоциты

FEATURES OF ADAPTIVE PLASMA CELL IMMUNE RESPONSE AT DIFFERENT STAGES OF POLYPOUS RHINOSINUSITIS

Lengina M.A., Korkmazov A.M., Kazachkov E.L., Medvedeva Yu.A.

South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

Abstract. Identification of phenotypes/genotypes in development of polypous rhinosinusitis enabled us to understand some mechanisms of remodeling mucous membranes in nasal cavity and paranasal sinuses, and choose optimal and effective treatment strategies. At the same time, the current studies show a continuing trend towards higher incidence of polypous rhinosinusitis, with frequent relapses accompanied by a significant decrease in quality of life. In this regard, the issues of searching markers of endotyping polypous rhinosinusitis remain relevant, thus enabling proper treatment to the patient at an early stage and ensuring clinical prognosis of the disease. Our aim was to analyze the relative density of immunocompetent lymphocytic cells with morphometric confirmation in patients with polypous rhinosinusitis with immune T2-inflammation. The study was conducted in a group of 22 patients with a verified diagnosis of polypous rhinosinusitis who were hospitalized for elective surgery. All patients were divided into the main group, the T2 polypous rhinosinusitis endotypem, and a comparison group which included patients with non-T2 polypous rhinosinusitis endotype. Anamnestic, clinical and laboratory data and morphometric criteria of both groups have been analyzed. In the main group of patients, there was a trend for distinct increase in absolute number of blood eosinophils (from 320 to 1512 cells/mL). The analysis of anamnestic data revealed increased frequency of repeated surgery (21.4%) in the patients from main group as compared to the control group (12.5%). A long disease history (29 years), and long relapse period (up to 27.5 years) was noted in the control group. In the main group, with shorter course of polypous rhinosinusitis (18.2 years), the duration of relapse was more than 4 times shorter compared to the time period of relapses in control group, being only 6 years. Morphometric analysis of intraoperatively taken polyp tissue has shown that the relative density of plasmocytes in the inflammatory polyp stroma in the main group of patients was higher than in the control group and reached 0.06 and 0.04 cells per 1 mm², respectively. The search for pathogenetic markers of morphometric features and immunological aspects of specific immune response in patients with polypous rhinosinusitis will make it possible to administer effective treatment to the patient and predict the outcome of the disease.

Keywords: polypous rhinosinusitis, endotype, immunity, cytokines, plasmocytes

Введение

В структуре обращаемости пациентов, за медицинской помощью к врачу оториноларингологу, лидирующее место занимают заболевания верхних дыхательных путей [1, 4]. Определенный интерес в этом контексте представляет хроническая патология носа и околоносовых пазух (ОНП) [5, 6]. Одним из вариантов является полипозный риносинусит (ПРС) развившийся вслед-

ствие патологического ремоделирования слизистых оболочек покрывающих ОНП и имеющий определенные тенденции к малигнизации [2, 6, 9]. В классификациях первых версий Европейских позиционных документов по риносинуситу и полипам носа от 2007, 2012 годов, хронический риносинусит позиционировался 2 фенотипами — с полипами (CRSwNP) и без полипоза (CRSSNP). Заболевание характеризовалось длительным течением (более 12 недель), полипоз носа под-

тверждался эндоскопической визуализацией в среднем носовом ходе с обеих сторон. В последних Европейских согласительных документах по лечению острого и хронического синусита и назальных полипов (EPOS 2020) ПРС включен в фенотип первичного диффузного хронического риносинусита [10]. Особое внимание в EPOS 2020 и адаптированных Российских клинических рекомендациях, уделяется следующим цитокинам: IL-4, IL-5, IL-13, посредством которых осуществляется запуск процесса ремоделирования ткани, что клинически проявляется склонностью к рецидивирующему течению заболевания. Участие врожденного иммунитета, осуществляется опосредованно через врожденные лимфоидные клетки второго типа. Роль приобретенного иммунитета в процессе длительного воспаления принадлежит В-лимфоцитам, базофилам, тучным клеткам, эозинофилам. Плазмоциты, являясь специализированными клетками В-клеточного звена, опосредованно участвуют в синтезе иммуноглобулинов, в частности отвечают за выработку IgE-антитела. Взаимодействуя с Т-клетками, плазмоциты влияют на выработку активных цитокинов: IL-4, IL-5 и IL-13, влияющих на нарушение целостности барьера, формирование мезенхимальной трансформации эпителия, субэпителиального фиброза и ремоделирования ткани [11, 12]. Таким образом, роли иммунного ответа в формировании ПРС уделяется особое внимание и активно рассматривается на протяжении нескольких десятилетий [7, 15].

Сложности в лечении полипоза носа обусловлены гетерогенностью пусковых факторов, обуславливающих патогенез воспалительных изменений слизистой оболочки носа и ОНП хронического характера, приводящих к рецидивам [3, 8]. В силу того, что фенотипы не позволяют «осветить» все патофизиологические аспекты развития заболевания, введены понятия «эндотипов» ПРС, отличающихся между собой как патофизиологическими механизмами, так и ответом на проводимое лечение. В последние годы проведено большое количество клинических исследований, позволяющих ориентироваться в выборе эффективной тактики лечения пациентов с ПРС. Выделены важнейшие клинико-лабораторные показатели активности процесса, что легло в основу дальнейших исследований. Вместе с тем, распространенность заболевания растет, и пациенты с значительным ухудшением качества жизни активно обращаются за медицинской помощью.

Таким образом, поиск маркеров «эндотипирования» ПРС, способных в ранние сроки назначить эффективное лечение пациенту, прогнозировать исход заболевания продолжают оставаться актуальной и обосновывают необходимость дальнейших поисков разрешения проблемы.

Цель — проанализировать относительную плотность иммунокомпетентных клеток лимфоцитарного ряда с морфометрическим подтверждением у пациентов полипозного риносинусита с иммунным Т2-воспалением.

Материалы и методы

Исследование проведено на клинических базах кафедр оториноларингологии и патологической анатомии ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России с участием 22 пациентов с клинически верифицированным диагнозом полипозного риносинусита. Работа одобрена этическим комитетом ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России № 9 от 22.09.22. и участвующими в сборе клинических данных учреждениями ГАУЗ «ГКБ № 6 г. Челябинск» и ГБУЗ ЧОПАБ. При включении участников в исследование у всех пациентов было получено информационное согласие. Критериями включения являлись пациенты с диагнозом ПРС (J33.8), в возрасте от 36-85 лет (59,1% пациентов были старше 50 лет, что соответствовало эпидемиологическим показателям клинических рекомендаций по полипозному риносинуситу, госпитализированные для выполнения хирургического лечения двусторонней полипоэтомидотомии [8]. Все пациенты отмечали существенное снижение качества жизни [2, 8]. Критериями не включения являлись: возраст до 18 и старше 85 лет, обострение ПРС, прием пероральных или интраназальных ГКС в течение 4 недель или антилейкотриенов в течение 2 недель до госпитализации, односторонний ПРС, опухоли носа и ОНП, синдром Картагенера, муковисцидоз, заболевания крови, туберкулез, ВИЧ, другие иммунодефицитные состояния.

В зависимости от анамнестических и лабораторно-инструментальных данных все пациенты были разделены на две группы: основную (n = 8) составили пациенты с ПРС «эндотипа Т2» и контрольную группу (n = 14) вошли больные с ПРС «эндотип Не-Т2». Всем пациентам в предоперационный период проведено клиническое обследование, включающее эндоскопический осмотр полости носа, компьютерную томографию носа и ОНП, общий анализ и биохимические показатели крови. Среди жалоб были зарегистрированы затруднение носового дыхания, снижение обоня-

ния, назальные выделения слизистого характера, постназальный затек, нарушение сна, снижение физической активности и апатия.

При выполнении эндоскопии полости носа у всех обследуемых визуализировались назальные полипы, распространяющиеся за пределы среднего носового хода 2-3-й стадии полипы по Lund V.J., Kennedy D.W., назальное отделяемое слизистого характера с постназальным затеканием [13]. На КТ околоносовых пазух визуализировалась obturация назальными полипами общего носового хода, снижение пневматизации околоносовых пазух полипы 6-8 баллов по Lund V.J., Maskay I.S. [14]. В клиническом анализе крови определялась эозинофилия до 1512 клеток/мкл.

При проведении двусторонней полипозотомии удаленные фрагменты полипозной ткани использовали для проведения морфометрического анализа. Критерием для исследования была выбрана плотность плазмочитов в инфильтрате. Для приготовления препаратов, полученный материал, фиксировали в 10% забуференном нейтральном формалине, обезживали в 99% изопропанол, заливали в парафин по стандартной методике. На ротаторном микротоме готовили срезы толщиной 5 мкм и окрашивали их гематоксилином и эозином с целью проведения обзорной микроскопии. В работе были использованы дополнительные иммуногистохимические окраски: экспрессию белков изучали иммуногистохимическим методом с использованием моноклональных мышиных антител к CD 138, который выявляет клетки плазмочитарной линии и их относительную плотность в инфильтрате. Просмотр осуществляли с помощью микроскопа Optika microscopes. Морфометрический анализ был проведен с помощью программы Морфология 5,2.

Результаты и обсуждение

Полученные данные общего анализа крови (ОАК) у пациентов контрольной группы с эндотипом He-T2 ПРС уровень абсолютного количества эозинофилов в крови варьировали от 65 до 180 клеток /мкл, что соответствует норме. Эндотип T2 ПРС сопровождается формированием 2-го типа иммунологического ответа с преобладанием эозинофильного воспаления, вследствие чего в ОАК пациентов основной группы прослеживается тенденция к четкому повышению данного показателя от 320 до 1512 клеток /мкл.

Сравнительный анализ анамнестических данных показал, что у 63% пациентов в основной

и у 50% контрольной групп не имели в анамнезе оперативного лечения. Исходя из этого, у пациентов имевших не длительный стаж заболевания, можно рассматривать как впервые выявленный ПРС. Высота показателей свидетельствует о высоком росте заболевания, актуализируя ценность проводимого исследования. Так, что у 50% пациентов контрольной группы в анамнезе присутствовали хирургические вмешательства по удалению назальных полипов, из них у 37,5% отмечено однократное проведение полипотомии носа, реоперации имели место в 12,55% случаев. В основной группе 35,7% пациентов указывали на проведенное хирургическое лечение заболевания. Однако, по данным ответов респондентов в пределах данной группы, частота выявления реопераций была выше, чем впервые выполненных оперативных вмешательств. Наиболее высокая кратность реопераций прооперированных больных указывает на необходимость повторной хирургической коррекции внутренней архитектуры полости носа в виду высокой склонности к рецидивам эндотипа T2 ПРС. В сравнении с частотой повторного оперативного лечения в группе контроля, у пациентов основной группы частота вновь выполненных хирургических вмешательств была выше, чем у больных ПРС эндотип He-T2, и составляла 21,4% в сравнении с 14,3% соответственно.

У пациентов контрольной группы, имеющих перенесенную двустороннюю полипозотомию в анамнезе, наряду с высоким стажем эндотипа He-T2 ПРС (29 лет) был отмечен длительный рецидив заболевания до 27,5 года, в то время как в основной группе на фоне менее длительного течения эндотипа T2 ПРС (18,2 года), продолжительность рецидива была более чем в 4 раза короче в сравнении временным периодом рецидивов в контрольной группе и составляла всего 6 лет.

При гистологическом исследовании ткани полипа в обеих группах визуализировались отчетная строма полипозной ткани, содержащая как отдельные кисты, железы и фибробласты, так и воспалительные инфильтраты, в состав которых вошли нейтрофилы, эозинофилы, лимфоциты, макрофаги и тучные клетки. Состав инфильтрата является важнейшей характеристикой воспалительного процесса, лежащего в основе ремоделирования слизистой полости носа и ОНП. В основной группе отмечено повышение относительной плотности плазмочитов в инфильтрате

по сравнению с контрольной группой и составляло 0,06 и 0,04 клеток в 1 мм² соответственно. Следует отметить, что плазматические клетки являются конечной формой В-лимфоцита, продуцирующего антитела и участвующего в синтезе иммуноглобулинов. Накопление их может свидетельствовать об активной роли иммунного ответа при активации хронического воспаления.

Выводы

Поиск патогенетических маркеров морфометрических особенностей и иммунологических аспектов формирования приобретенного иммунного ответа у пациентов с полипозным риносинуситом позволит назначать эффективное лечение пациенту и ориентировать его относительно прогноза болезни.

Список литературы / References

1. Коркмазов М.Ю., Корнова Н.В., Ленгина М.А., Смирнов А.А., Коркмазов А.М., Дубинец И.Д. Эффективная антибактериальная терапия внебольничной оториноларингологической респираторной инфекции (клиническое описание) // Медицинский совет, 2022. № 20. С. 73-81. [Korkmazov M.Yu., Kornova N.V., Lengina M.A., Smirnov A.A., Korkmazov A.M., Dubinets I.D. Effective antibiotic therapy for community-acquired otorhinolaryngological respiratory infection (clinical description). *Meditsinskiy sovet = Medical Council*, 2022, no. 20, pp. 73-81. (In Russ.)]
2. Коркмазов М.Ю., Ленгина М.А., Коркмазов А.М., Кравченко А.Ю. Влияние постковидного синдрома на качество жизни пациентов с аллергическим ринитом и эозинофильным фенотипом хронического полипозного риносинусита // Российский медицинский журнал, 2023. Т. 29, № 4. С. 277-290. [Korkmazov M.Yu., Lengina M.A., Korkmazov A.M., Kravchenko A.Y. Effect of post-COVID syndrome on the quality of life of patients with allergic rhinitis and eosinophilic phenotype of chronic polyposis rhinosinusitis. *Rossiiskii meditsinskii zhurnal = Medical Journal of the Russian Federation*, 2023, Vol. 29, no. 4, pp. 277-290. (In Russ.)]
3. Коркмазов М.Ю., Зырянова К.С., Белoshангин А.С. Оценка клинической эффективности фитотерапевтического лекарственного препарата в лечении и профилактике рецидивов острых риносинуситов у детей г. Челябинска // Медицинский совет, 2016. № 7. С. 90-93. [Korkmazov M.Yu., Zyryanova K.S., Beloshangin A.S. Evaluation of the clinical efficacy of a phytotherapeutic drug in the treatment and prevention of recurring acute rhinosinusitis in children of Chelyabinsk. *Meditsinskiy sovet = Medical Council*, 2016, no. 7, pp. 90-93. (In Russ.)]
4. Коркмазов М.Ю., Ястремский А.П., Корнова Н.В., Ленгина М.А., Коркмазов А.М. Лечебно-диагностические подходы в терапии хронического тонзиллита // Медицинский совет, 2022. № 20. С. 90-99. [Korkmazov M.Yu., Yastremsky A.P., Kornova N.V., Lengina M.A., Korkmazov A.M. Therapeutic and diagnostic approaches in the treatment of chronic tonsillitis. *Meditsinskiy sovet = Medical Council*, 2022, no. 20, pp. 90-99. (In Russ.)]
5. Коркмазов М.Ю., Казачков Е.Л., Ленгина М.А., Дубинец И.Д., Коркмазов А.М. Причинно-следственные факторы развития полипозного риносинусита // Российская ринология, 2023. Т. 31, № 2. С. 124-130. [Korkmazov M.Yu., Kazachkov E.L., Lengina M.A., Dubinets I.D., Korkmazov A.M. Cause-effect factors of rhinosinusitis poliposa development. *Rossiyskaya rinologiya = Russian Rhinology*, 2023, Vol. 31, no. 2, pp. 124-130. (In Russ.)]
6. Коркмазов М.Ю., Ангелович М.С., Ленгина М.А., Белоусов С.Ю. Клинический случай ангиосаркомы решетчатого лабиринта и лобной пазухи, вопросы морфологической верификации диагноза // Вестник оториноларингологии, 2022. Т. 87, № 4. С. 102-106. [Korkmazov M.Yu., Angelovich M.S., Lengina M.A., Belousov S.Y. Clinical case of angiosarcoma of the latticed labyrinth and frontal sinus, issues of morphological verification of diagnosis. *Vestnik otorinolaringologii = Bulletin of Otorhinolaryngology*, 2022, Vol. 87, no. 4, pp. 102-106. (In Russ.)]
7. Лазарева А.М., Смирнова О.В. Иммунологические особенности различных фенотипов хронического риносинусита // Медицинская иммунология, 2025. Т. 27, № 2. С. 275-286. [Lazareva, A.M., Smirnova O.V. Immunological features of various phenotypes of chronic rhinosinusitis. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2025, Vol. 27, no. 2, pp. 275-286. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-IFO-3026.
8. Полипозный риносинусит: клинические рекомендации. М., 2019. 34 с. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://www.vodkb.ru/wp-content/uploads/pages/documents/klin-recomend/Polipoznyj-rinosinusit19.pdf>. [Polypous rhinosinusitis: clinical recommendations]. Moscow, 2019. 34 p. [Electronic resource]. Available at: <https://www.vodkb.ru/wp-content/uploads/pages/documents/klin-recomend/Polipoznyj-rinosinusit19.pdf>.
9. Полипозный риносинусит: клинические рекомендации. М., 2024. 37 с. Режим доступа: https://cr.minzdrav.gov.ru/view-cr/890_1. [Polypous rhinosinusitis: clinical recommendations]. Moscow, 2024. 37 p. Available at: https://cr.minzdrav.gov.ru/view-cr/890_1.

10. Fokkens W.J., Lund V.J., Hopkins C., Hellings P.W., Kern R., Reitsma S., Toppila-Salmi S., Bernal-Sprekelsen M., Mullol J. Executive summary of EPOS 2020 including integrated care pathways. *Rhinology*, 2020, Vol. 58, no. 2, pp. 82-111.
11. Halderman A., Lane AP. Genetic and Immune Dysregulation in Chronic Rhinosinusitis. *Otolaryngol. Clin. North Am.*, 2017, Vol. 50, no. 1, pp. 13-28.
12. Ho J., Bailey M., Zaunders J., Mrad N., Sacks R., Sewell W., Harvey R.J. Group 2 innate lymphoid cells (ILC2s) are increased in chronic rhinosinusitis with nasal polyps or eosinophilia. *Clin. Exp. Allergy*, 2015, Vol. 45, no. 2, pp. 394-403.
13. Lund V.J., Kennedy D.W. Quantification for staging sinusitis. The Staging and Therapy Group. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol. Suppl.*, 1995, Vol. 167, pp. 17-21
14. Lund V., Mackay I.S. Staging in chronic rhinosinusitis. *Rhinology*, 1993, Vol. 31, no. 4, pp. 183-184.
15. Pan L., Liu Z. Classification of chronic rhinosinusitis with nasal polyps based on eosinophilic inflammation. *Zhonghua Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi*, 2019, Vol. 54, no. 3, pp. 222-226. (In Chinese)

Авторы:

Ленгина М.А. — к.м.н., доцент кафедры оториноларингологии ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Челябинск, Россия

Коркмазов А.М. — к.м.н., доцент кафедры оториноларингологии ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Челябинск, Россия

Казачков Е.Л. — д.м.н., профессор, заведующий кафедрой патологической анатомии и судебной медицины ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Челябинск, Россия

Медведева Ю.А. — к.м.н., доцент кафедры патологической анатомии и судебной медицины ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Челябинск, Россия

Authors:

Lengina M.A., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Otorhinolaryngology, South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

Korkmazov A.M., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Otorhinolaryngology, South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

Kazachkov E.L., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Pathological Anatomy and Forensic Medicine, South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

Medvedeva Yu.A., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Pathological Anatomy and Forensic Medicine, South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

Поступила 29.03.2025
Отправлена на доработку 18.04.2025
Принята к печати 25.05.2025

Received 29.03.2025
Revision received 18.04.2025
Accepted 25.05.2025

ОСОБЕННОСТИ СУБПОПУЛЯЦИЙ ЛИМФОЦИТОВ У ПАЦИЕНТОВ С РАЗНЫМИ ФОРМАМИ ГИПЕР-IgE-СИНДРОМА

Давыдова Н.В.¹, Зиновьева Н.В.¹, Сударикова Е.В.¹,
Севостьянова Ю.Н.¹, Петрова Ю.В.¹, Борисова Т.А.¹, Галеева Е.В.¹,
Гильдеева Г.Н.², Козлов И.Г.²

¹ ГБУЗ «Детская городская клиническая больница № 9 имени Г.Н. Сперанского» Департамента
здравоохранения г. Москвы, Москва, Россия

² ФГАОУ «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова»
Министерства здравоохранения РФ (Сеченовский Университет), Москва, Россия

Резюме. Для пациентов с гипер-IgE-синдромом характерны эозинофилия, низкие уровни маркеров воспаления, тяжелые деструктивные пневмонии, хронический кандидоз слизистых, тяжелый атопический дерматит, поражения скелета: остеопения и патологические переломы, сколиоз, поздняя смена молочных зубов. В основе патогенеза данного синдрома лежат дефекты трансдукции сигнала с цитокиновых рецепторов, которые могут быть вызваны мутациями в гене *STAT3* (аутосомно-доминантная форма), *ZNF341*, *DOCK8*, *PGM3* и *CARD11* (аутосомно-рецессивная форма) и в генах, кодирующих субъединицы цитокиновых рецепторов (*IL6ST* и др.). Цель исследования заключалась в анализе субпопуляций лимфоцитов у пациентов с разными формами гипер-IgE-синдрома. В исследование были включены 9 пациентов с диагнозом «гипер-IgE-синдром». Субпопуляции лимфоцитов оценивали методом проточной цитометрии, IgE общий – иммунотурбидиметрии, секвенирование ДНК – NGS. У пациентов были обнаружены мутации в разных экзонах гена *STAT3* и в гене *IL6ST*. Не было обнаружено статистически значимых различий между субпопуляциями CD3 Т-лимфоцитов: CD4 Т-хелперами наивными и памяти, CD8 Т-цитотоксическими наивными и памяти, ранними тимическими эмигрантами, Т-регуляторными клетками, Т-хелперами 1-го и 2-го типа по сравнению с контрольной группой ($p > 0,05$). Однако субпопуляция Т-хелперов 17 была значительно снижена, как по относительному ($p < 0,001$), так и по абсолютному количеству ($p = 0,003$) только у пациентов с мутациями в гене *STAT3*. У пациентов с гипер-IgE-синдромом было снижено как относительное ($p < 0,001$), так и абсолютное количество непереключенных ($p = 0,001$) и переключенных В-клеток памяти ($p = 0,007$). Также наблюдалось снижение относительного количества плазмбластов ($p = 0,022$) и активированных В-лимфоцитов ($p = 0,001$). Количество Т-хелперов 17 отличалось у пациентов с

Адрес для переписки:

Давыдова Наталья Владимировна
ГБУЗ «Детская городская клиническая больница № 9
имени Г.Н. Сперанского» Департамента
здравоохранения г. Москвы
123317, Россия, г. Москва, Шмитовский проезд, 29.
Тел.: 8 (916) 447-82-03.
E-mail: nata1902@yandex.ru

Address for correspondence:

Natalia V. Davydova
G. Speransky City Children's Hospital No. 9
29 Schmitovsky Pass
Moscow
123317 Russian Federation
Phone: +7 (916) 447-82-03.
E-mail: nata1902@yandex.ru

Образец цитирования:

Н.В. Давыдова, Н.В. Зиновьева, Е.В. Сударикова,
Ю.Н. Севостьянова, Ю.В. Петрова, Т.А. Борисова,
Е.В. Галеева, Г.Н. Гильдеева, И.Г. Козлов «Особенности
субпопуляций лимфоцитов у пациентов с разными
формами гипер-IgE-синдрома» // Российский
иммунологический журнал, 2025. Т. 28, № 3. С. 631-638.
doi: 10.46235/1028-7221-17168-FOL

© Давыдова Н.В. и соавт., 2025

Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

N.V. Davydova, N.V. Zinovieva, E.V. Sudarikova,
Yu.N. Sevostyanova, Yu.V. Petrova, T.A. Borisova,
E.V. Galeeva, G.N. Gildeeva, I.G. Kozlov "Features
of lymphocyte subpopulations in patients with different forms
of hyper-IgE syndrome", Russian Journal of Immunology/
Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2025, Vol. 28, no. 3,
pp. 631-638.
doi: 10.46235/1028-7221-17168-FOL

© Davydova N.V. et al., 2025

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

DOI: 10.46235/1028-7221-17168-FOL

разными формами гипер-IgE-синдрома. Снижение В-клеток памяти было характерно для всех типов мутаций. Используемый нами метод оценки Т-хелперов 17 показал свою диагностическую эффективность. Наблюдались отличия в клинической картине и тяжести течения заболевания в зависимости от домена белка STAT3, в котором произошла мутация. Однако для того, чтобы сделать окончательные выводы по данному предположению, необходимы дальнейшие исследования с большим количеством пациентов.

Ключевые слова: гипер-IgE-синдром, STAT3, IL6ST, Т-хелперы 17, В-лимфоциты памяти непереключенные, В-лимфоциты памяти переключенные

FEATURES OF LYMPHOCYTE SUBPOPULATIONS IN PATIENTS WITH DIFFERENT FORMS OF HYPER-IgE SYNDROME

Davydova N.V.^a, Zinovieva N.V.^a, Sudarikova E.V.^a, Sevostyanova Yu.N.^a, Petrova Yu.V.^a, Borisova T.A.^a, Galeeva E.V.^a, Gildeeva G.N.^b, Kozlov I.G.^b

^a G. Speransky City Children's Hospital No. 9, Moscow, Russian Federation

^b I. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation

Abstract. Patients with hyper-IgE syndrome are characterized by eosinophilia, low levels of inflammatory markers, severe destructive pneumonia, chronic mucosal candidiasis, severe atopic dermatitis, skeletal lesions: osteopenia and pathological fractures, scoliosis, delayed change of primary teeth. The pathogenesis of this syndrome is based on defects in signal transduction from cytokine receptors, caused by mutations in the *STAT3* gene (autosomal dominant form), *ZNF341*, *DOCK8*, *PGM3* and *CARD11* (autosomal recessive form) and in genes encoding cytokine receptor subunits (*IL6ST*, etc.). The aim of our study was to analyze lymphocyte subpopulations in patients with different forms of hyper-IgE syndrome. The study included 9 patients with hyper-IgE syndrome. Lymphocyte subpopulations were assessed by flow cytometry; total IgE, by immunoturbidimetry; DNA sequencing, by means of NGS methodology. Mutations in different exons of the *STAT3* gene and in the *IL6ST* gene were detected in patients. No statistically significant differences were found between patients and control group of CD3 T cell subpopulations, i.e., CD4 T helpers (naive and memory cells), CD8 T cytotoxic (naive and memory cells), early thymic emigrants, Treg cells, T helpers (type 1 and 2) ($p > 0.05$). However, the subpopulation of T helpers 17 was significantly reduced, both in relative ($p < 0.001$) and absolute numbers ($p = 0.003$) only in patients with mutations in the *STAT3* gene. In patients with hyper-IgE syndrome, we have found a reduction of both relative ($p < 0.001$) and absolute numbers of unswitched ($p = 0.001$) and switched memory B cells ($p = 0.007$). A decreased relative number of plasmablasts ($p = 0.022$) and activated B lymphocytes ($p = 0.001$) was also observed. The number of T helpers 17 depended on the type of hyper-IgE syndrome. Memory B cells were reduced in all mutation types. The method of assessing T helper 17 demonstrated its diagnostic efficiency. The differences were observed in clinical pattern and severity of the disease depending on the STAT3 protein domain mutation. However, further studies with a larger number of patients are required.

Keywords: hyper-IgE syndrome, STAT3, IL6ST, T helper 17, unswitched memory B lymphocytes, switched memory B lymphocytes

Введение

Синдром Джоба был впервые описан в 1966 году у пациентов с рецидивирующими холодными стафилококковыми абсцессами и респираторными инфекциями [3]. В 1972 году пациентов с этими клиническими проявлениями и высоким уровнем IgE стали относить к гипер-IgE-синдрому (HIES) [2]. Для этих пациентов также часто характерны эозинофилия, низкие уровни маркеров воспаления, хронический кандидоз слизистых,

а также поражение кожи (тяжелый атопический дерматит), скелета (остеопения, сколиоз, поздняя смена молочных зубов) [14].

HIES-синдром обычно наследуется как ауто-сомно-доминантный (AD гипер IgE). В 2007 году впервые у пациентов с полным фенотипом HIES были описаны моноаллельные доминантно-негативные миссенс-мутации в гене, кодирующем белок STAT3 (трансдуктор сигнала и активатор транскрипции-3). Частота встречаемости таких мутаций — менее 1 случая на 1 000 000 [5, 9].

В некоторых случаях при типичных клинических признаках HIES были обнаружены аутомно-рецессивные мутации (AR HIES). Часть пациентов с AR HIES имеют мутации в гене *ZNF341*, кодирующем транскрипционный фактор, регулирующий экспрессию *STAT3*, а также мутации в генах *DOCK8*, *PGM3* и *CARD11* [15].

Также характерные фенотипические особенности HIES обнаруживают у пациентов с мутациями в генах цитокинов и их рецепторов, связанных сигнальными путями со *STAT3*. Так, например, для пациентов с полным дефектом *IL-6R* характерны рецидивирующие инфекции кожи и легких, экзема, высокий уровень IgE, аномальный острофазный ответ и эозинофилия [6, 12]. А пациенты с мутацией в гене *IL6ST*, который отвечает за экспрессию GP130 (сигнальной субъединицы, входящей в состав рецепторов семейства цитокинов *IL-6*, к которому относятся также *IL-11*, *IL-27*, *LIF*, *IL-35* и др.), демонстрируют рецидивирующие инфекции легких, экзему, эозинофилию, высокий уровень IgE, измененный острофазный ответ, краниосиностоз, сколиоз, сохранение молочных зубов [1, 10, 11].

Сниженный сигнал с цитокиновых рецепторов, вследствие мутаций в GP130 и *STAT3*, приводит к нарушениям в субпопуляциях лимфоцитов. Существует мнение, что стафилококковые абсцессы связаны с дефектом Th17-лимфоцитов, которые продуцируют *IL-17*, вырабатываемый в ответ на золотистый стафилококк, кандиды и грамотрицательные бактерии. Их дифференцировка зависит от *STAT3*. Такие же стафилококковые инфекции характерны при других дефектах *IL-17*, включая дефицит *IL-17RA* [8, 13, 14].

Пациенты с мутациями в *STAT3* демонстрируют нарушения в формировании Т- и В-лимфоцитов памяти. Созревание В-лимфоцитов также зависит от *STAT3*, тесно связано с *IL-21* и субпопуляцией фолликулярных Т-лимфоцитов, дефекты в которых приводят к ослабленному специфическому гуморальному ответу на антиген при нормальном уровне иммуноглобулинов [4, 13].

Целью настоящего исследования являлся анализ субпопуляций лимфоцитов у пациентов с разными формами HIES.

Материалы и методы

Дизайн исследования

В исследование были включены 9 пациентов в возрасте от 6 мес. до 17 лет с диагнозом «HIES». Письменное разрешение родителей было получено на все проводимые исследования.

Проточная цитометрия

Субпопуляции лимфоцитов оценивали методом проточной цитометрии на проточном цитофлуориметре FACSCantoII (FACS Diva 7.0,

Becton Dickinson, США). Пробоподготовку проводили по стандартной методике. Т-лимфоциты, Т-хелперы и Т-цитотоксические лимфоциты определяли с помощью комбинации антител CD3 FITC/CD8 PE/CD45 PerCp/CD4 APC. Клетки центральной, эффекторной памяти и наивные Т-клетки – CD3 Amcyan/CD4 FITC/CD8 PerCp/CD62L PE/CD45RA PE-Cy7/CD45RO APC. Ранние тимические мигранты (RTE) – CD3 Amcyan/CD4 FITC/CD8 PerCp/CD45RA PE-Cy7/CD31 PE. Т-регуляторные клетки – CD4 FITC/CD25 PE-Cy7/CD127 APC. Субпопуляции Т-хелперов Th1, Th2, Th17, Th17.1 – CD3 PerCp/CD4 FITC/CD196 BV421/CD183 PE. Все используемые антитела были от компании Becton Dickinson, США.

В-лимфоциты памяти и наивные определяли с помощью комбинации антител CD19 PC5 (Beckman Coulter, Франция)/CD27 PE (Becton Dickinson, США)/IgD FITC (Thermo Fisher, США)/IgM APC (Thermo Fisher, США). В-лимфоциты транзиторные, плазмбласты и активированные – CD19 PC5 (Beckman Coulter)/CD38 PE (Beckman Coulter)/CD21 FITC (Beckman Coulter)/IgM APC (Thermo Fisher, США). В1-лимфоциты – CD19 FITC (Beckman Coulter, Франция)/CD5 PE (Becton Dickinson, США).

Анализ общего IgE выполняли методом иммунотурбидиметрии на биохимическом анализаторе Архитект С8000 (Abbot, США).

Секвенирование ДНК проводили в лаборатории молекулярной иммунологии НМИЦ ДГОИ им. Д. Рогачева на платформе NextSeq Illumina и в лаборатории Genetics.

Статистический анализ

Статистический анализ выполняли в программе SPSS Statistics, версия 22 (IBM, США). Использовали U-критерий Манна-Уитни и t-критерий Стьюдента. Различия между сравниваемыми параметрами считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Объекты исследования

В исследовании принимали участие 9 пациентов (Р), средний возраст которых $10,13 \pm 1,57$, и в качестве сравнения группа из 71 условно здорового контроля (К) в возрасте $10,26 \pm 0,49$.

Результаты секвенирования ДНК

У 4 пациентов (Р5, Р6, Р7 и Р8) были обнаружены гетерозиготные миссенс-мутации в гене *STAT3*, при которых наблюдается замена одной аминокислоты на другую в SH2-домене белка *STAT3*. У пациента Р9 миссенс-мутация в гене *STAT3* затрагивает трансактивационный домен белка (TRA). У пациента Р4 обнаружена мутация сразу в двух экзонах гена *STAT3*. В 20-м экзоне это дупликация 6 нуклеотидов, затрагивающая

ТАБЛИЦА 1. КЛИНИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПАЦИЕНТОВ

TABLE 1. CLINICAL CHARACTERISTICS OF PATIENTS

Пациенты Patients	Возраст (годы) Age (years)	Пол М/Ж Sex (M/F)	Мутации Mutations	Домен Domen	Абсцесс Abscess	Пневмония Pneumonia	АД/экзема AD/eczema	Поражение костей Bone damage	Ст./канд. St./Cand.	Другие Other
P1	13	М M	Нет в STAT3 No in STAT3	–	+	+	–	+	+	ЛПС LPS ЛД FD
P2	8	М M	н. д. n. d.	–	+	+	+	–	+	–
P3	15	М M	IL6ST c.456dup c.260C>T	–	–	–	–	+	+	Lichtheimia ram/cor
P4	2	М M	STAT3 c.1781_1786dup c.2177T>C	SH2 TRA	+	–	+	+	+	Отиты Otitis
P5	0,5	Ж F	STAT3 c.1909G>A	SH2	+	+	+	–	+	–
P6	8	М M	STAT3 c.1954G>A	SH2	+	+	+	–	+	–
P7	12	Ж F	STAT3 c.1954G>A	SH2	+	+	+	–	+	ЛД FD
P8	14	Ж F	STAT3 c.1907C>T	SH2	+	+	–	–	+	Отиты Otitis
P9	17	М M	STAT3 c.2132T>C	TRA	+	–	+	+	+	Отиты Otitis Панариции Panaritium
P10	35	Ж F	STAT3 c.1954G>A	SH2 (25%)	–	–	–	–	–	–

Примечание. АД – atopический дерматит, Ст./канд. – стафилококковая и кандидозная инфекции, ЛПС – лимфопролиферативный синдром, ЛД – лицевые дисморфизмы, н. д. – нет данных.

Note. AD, atopic dermatitis; St./Cand., staphylococcus and candida infections; LPS, lymphoproliferative syndrome; FD, facial dysmorphisms; n. d., no data.

ТАБЛИЦА 2. ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ

TABLE 2. IMMUNOLOGICAL INDICATORS

Пациенты Patients	IgE общий, МЕ/мл IgE total, UI/mL	Th17, %	Неперекл. В памяти, % Non sw B memory, %	Перекл. В памяти, % Sw B memory, %	Плазма- бласты, % Plasmablasts, %	В активир., % B activated %
P1	2523 ↑	5,6	0,6 ↓	2,5 ↓	0,3 ↓	4,3
P2	17409 ↑	3,1 ↓	2,0 ↓	3,4 ↓	0,3 ↓	0,9 ↓
P3	175 ↑	10,7	1,8 ↓	3,8 ↓	0,2 ↓	0,8 ↓
P4	291 ↑	1,1 ↓	1,4 ↓	1,4 ↓	0,3 ↓	0,5 ↓
P5	740 ↑	н. д. n. d.	0,8 ↓	0,4 ↓	0,1 ↓	0,4
P6	40034 ↑	3,0 ↓	2,8 ↓	5,4 ↓	1,1	1,7 ↓
P7	27620 ↑	2,2 ↓	2,4 ↓	4,6 ↓	1,0	2,6 ↓
P8	9130 ↑	1,2 ↓	3,4 ↓	8,8	0,5 ↓	1,8 ↓
P9	3480 ↑	н. д. n. d.	4,3 ↓	6,9 ↓	0,1 ↓	2,3
P10	800 ↑	7,4	5,2 ↓	15,1	0,8	2,3

Примечание. ↑ ↓ – выше или ниже возрастной нормы, н. д. – нет данных.

Note. ↑ ↓, above or below age norm; n. d., no data.

домен SH2, тогда как в 23-м экзоне — миссенс-мутация в TRA-домене.

У двух пациентов мутации в гене *STAT3* не обнаружены. Пациенту P1 сделали только секвенирование по Сенгеру гена *STAT3*, и дальнейшие поиски аутосомно-рецессивных мутаций не проводились, а у пациента P3 обнаружены инсерция, приводящая к сдвигу рамки считывания, и миссенс-мутация в гене *IL6ST*.

Пациенту P2, к сожалению, секвенирование не было проведено в результате отказа родителей, но по всем клиническим и лабораторным признакам он очень близок к пациентам с миссенс-мутацией в гене *STAT3*.

P10 — мать пациентов P6 и P7. У нее та же миссенс-мутация затрагивает только 25% аллеля гена *STAT3*, и при этом нет никаких клинических проявлений (табл. 1).

Субпопуляции Т-лимфоцитов

Не было выявлено статистически значимых различий по субпопуляциям Т-лимфоцитов по сравнению с контрольной группой. Однако относительное и абсолютное количество Th17 Т-хелперов (CD3⁺CD4⁺CD196⁺CD183⁻) было снижено у пациентов с мутациями в гене *STAT3*: P 2,2%; К 5,9%, $p < 0,001$ и P 26,3 кл/мкл; К 54,0 кл/мкл, $p = 0,003$, соответственно. У пациентов без мутаций в гене *STAT3* показатели Th17 не выходили за рамки диапазона нормальных значений (табл. 2).

У пациентки P10 при нормальном уровне Th17 и Th17.1, наблюдали повышение Th1: 39,9% (11,6-27,8) и снижение Th2: 41,1% (50,2-78,3).

Субпопуляции В-лимфоцитов

Не было получено статистически значимых различий для В-лимфоцитов и В1-лимфоцитов. В-клетки памяти (CD19⁺CD27⁺), В-клетки памяти непереключенные (non sw) (CD19⁺IgD⁺CD27⁺), В-клетки памяти переключенные (sw) (CD19⁺IgD⁻CD27⁺) были значительно снижены как по относительному (non sw: P 2,4%; К 10,9%, $p < 0,001$, sw: P 4,6%; К 12,8%, $p < 0,001$), так и по абсолютному количеству (non sw: P 22,0 кл/мкл; К 50,0 кл/мкл, $p = 0,001$, sw: P 22,0 кл/мкл; К 59,0 кл/мкл, $p = 0,007$) в группе пациентов с мутацией в *STAT3*. Статистически значимое снижение было характерно также для относительного количества активированных В-лимфоцитов (CD19⁺CD21^{low}CD38^{low}) (P 1,7%; К 3,7%, $p = 0,001$) и плазмабластов (CD19⁺IgM⁻CD38^{hi}) (P 0,5%; К 0,9, $p = 0,022$). Транзиторные (CD19⁺IgM^{hi}CD38^{hi}) и IgM only В-лимфоциты не отличались от показателей контрольной группы.

У пациентов без мутаций в *STAT3* В-клетки памяти и плазмабласты также были снижены (табл. 2).

В данном исследовании мы сфокусировались на оценке состояния субпопуляций лимфоцитов у пациентов с HIES, разделив их в зависимости от типа мутаций.

Большинство пациентов с HIES имеют мутацию в разных доменах гена *STAT3* (около 75%). Наши данные подтверждают эту тенденцию. Среди небольшой выборки наших пациентов точно подтверждена мутация в гене *STAT3* у 6 из 9 (66%).

Оценка Т-лимфоцитов (наивных и памяти) не показала значимых различий этих показателей по сравнению с контрольной группой. По данным других авторов, наблюдалось повышение наивных и соответствующее снижение Т-клеток центральной памяти, эффекторной памяти и TEMRA у CD4⁺ и CD8⁺ лимфоцитов [7]. Исследование субпопуляций Т-хелперов выявило значительное снижение Th17-лимфоцитов, которое соответствовало данным других авторов. В нашем исследовании хорошо проявил себя упрощенный метод фенотипирования субпопуляций Т-хелперов с использованием комбинации двух антител к хемокиновым рецепторам CD196 (CCR6) и CD183 (CXCR3) по сравнению с классическим вариантом [7].

Оценка В-лимфоцитов также продемонстрировала резкий контраст по сравнению со здоровыми донорами. Несмотря на нормальное количество В-лимфоцитов, для них характерен менее зрелый фенотип. Повышены наивные В-лимфоциты и снижены non sw (Т-независимые) и sw (Т-зависимые) В-клетки памяти. Кроме того, были снижены плазмбласты и активированные В-лимфоциты.

Данные особенности иммунного статуса лежат в основе клинической симптоматики у наших пациентов с мутацией в *STAT3*. Снижение Th17 объясняет их экстремальную чувствительность к *Candida albicans* и золотистому стафилококку. Кроме того, редукция В-клеток памяти и плазмбластов отражается на долго живущем гуморальном иммунитете.

Полученные нами данные отражают критическую роль *STAT3* в поддержании функций различных субпопуляций лимфоцитов. Изучение мутаций специфических цитокинов и их рецепторов, сигналы с которых проходят через *STAT3* выявило, что IL-21/IL-21R/*STAT3* ключевые для созревания В-клеток памяти, а IL-23R/IL-12Rβ1/*STAT3* и IL-21/IL-21R/*STAT3* — для Th17-клеток [8, 13, 14].

Четверо наших пациентов (P5, P6, P7, P8) имели мутацию в SH2-домене *STAT3*. Можно отметить, что у них в клинической картине преобладают двусторонняя деструктивная пневмония, абсцессы мягких тканей и атопический дерматит. У пациента с мутацией в TRA-домене (P9) превалируют рецидивирующие гнойные отиты и панариции. У пациента с комбинированной мутацией в доменах SH2 и TRA (P4) на первом месте абсцессы мягких тканей и суставов.

Среди наших пациентов двое не имели мутации в гене *STAT3*. Один из них P1 до конца не изучен. Его клиническая картина, с одной стороны, очень похожа на ту, которая наблюдается у пациентов с мутацией *STAT3* (пневмонии), а, с другой стороны, особняком стоит его склонность к лимфопролиферации. Важным лабораторным признаком этого пациента является нормальный уровень Th17. У второго пациента P3 были выявлены две гетерозиготные мутации в 4-м и 5-м экзонах гена *IL6ST*. Пациент разительно отличался как по клиническим, так и по лабораторным признакам от пациентов с мутацией *STAT3*. Среди клинических проявлений преобладали поражения костной ткани, такие как остеомиелит (в биоптате грибок *Lichteimia*), артрит, патологические переломы. Для него совершенно не были характерны деструктивная пневмония и абсцессы мягких тканей. Однако при сниженном количестве В-клеток памяти уровень Th17 был выше медианного значения. Возможно, нормальный уровень Th17 связан с тем, что gp130 не входит в состав рецепторов IL-21R/IL-23R/IL-12Rβ1, которые задействованы в дифференцировке этих клеток. Однако остается вопрос о причине снижения В-клеток памяти. Скорее всего в нем принимают участие какие-то другие цитокины семейства IL-6, оказывающие влияния на созревание В-лимфоцитов и несущие в составе своих рецепторов мутантную субъединицу gp130.

Выводы

Наши результаты подтверждают ранее полученные данные на больших когортах пациентов о ключевой роли Th17 в диагностике HIES. Уровень Th17 отличался у пациентов с разными формами гипер-IgE-синдрома. Тогда как снижение В-клеток памяти было характерно для всех типов мутаций.

Используемая нами комбинация антител для определения Th17 показала свою диагностическую эффективность.

Были обнаружены отличия в клинической картине и тяжести течения заболевания в зависимости от домена *STAT3*, в котором произошла мутация. В связи с маленькой выборкой пациентов сложно делать далеко идущие выводы о связи мутаций в различных доменах с преобладанием определенных клинических проявлений. Для этого необходимо проведение дальнейших исследований с большим количеством пациентов.

Благодарности

Выражаем благодарность компании ООО «Биолайн», которая любезно предоставила антитела CD196 BV421 и CD183 PE для выполнения данного исследования.

Список литературы / References

1. Béziat V., Tavernier S.J., Chen Y.H., Ma C.S., Materna M., Laurence A., Staal J., Aschenbrenner D., Roels L., Worley L., Claes K., Gartner L., Kohn L.A., De Bruyne M., Schmitz-Abe K., Charbonnier L.-M., Keles S., Nammour J., Vladikine N., Renkilaraj M.R.L.M., Seeleuthner Y., Migaud M., Rosain J., Jeljeli M., Boisson B., Van Braeckel E., Rosenfeld J.A., Dai H., Burrage L.C., Murdock D.R., Lambrecht B.N., Avettand-Fenoel V., Vogel T.P.; Undiagnosed Diseases Network; Esther C.R., Haskologlu S., Dogu F., Ciznar P., Boutboul D., Ouachée-Chardin M., Amourette J., Lebras M.-N., Gauvain C., Tcherakian C., Ikinciogullari A., Beyaert R., Abel L., Milner J.D., Grimbacher B., Couderc L.-J., Butte M.J., Freeman A.F., Catherinot É., Fieschi C., Chatila T.A., Tangye S.G., Uhlig H.H., Haerynck F., Casanova J.-L., Puel A. Dominant-negative mutations in human IL6ST underlie hyper-IgE syndrome. *J. Exp. Med.*, 2020, Vol. 217, no. 6, e20191804. doi: 10.1084/jem.20191804.
2. Buckley R.H., Wray B.B., Belmaker E.Z. Extreme hyperimmunoglobulinemia E and undue susceptibility to infection. *Pediatrics*, 1972, Vol. 49, no. 1, pp. 59-70.
3. Davis S.D., Schaller J., Wedgwood R.J. Job's Syndrome. Recurrent, "cold", staphylococcal abscesses. *Lancet*, 1966, Vol. 1, no. 7445, pp. 1013-1015.
4. Deenick E.K., Avery D.T., Chan A., Berglund L.J., Ives M.L., Moens L., Stoddard J.L., Bustamante J., Boisson-Dupuis S., Tsumura M., Kobayashi M., Arkwright P.D., Averbuch D., Engelhard D., Roesler J., Peake J., Wong M., Adelstein S., Choo S., Smart J.M., French M.A., Fulcher D.A., Cook M.C., Picard C., Durandy A., Klein C., Holland S.M., Uzel G., Casanova J.-L., Ma C.S., Tangye S.G. Naive and memory human B cells have distinct requirements for STAT3 activation to differentiate into antibody-secreting plasma cells. *J. Exp. Med.*, 2013, Vol. 210, no. 12, pp. 2739-2753.
5. Kane A., Deenick E.K., Ma C.S., Cook M.C., Uzel G., Tangye S.G. STAT3 is a central regulator of lymphocyte differentiation and function. *Curr. Opin. Immunol.*, 2014, Vol. 28, pp. 49-57.
6. Kotlarz D., Zietara N., Milner J.D., Klein C. Human IL-21 and IL-21R deficiencies: two novel entities of primary immunodeficiency. *Curr. Opin. Pediatr.*, 2014, Vol. 26, no. 6, pp. 704-712.
7. Ma C.S., Tangye S.G. Flow cytometric-based analysis of defects in lymphocyte differentiation and function due to inborn errors of immunity. *Front. Immunol.*, 2019, Vol. 10, 2108. doi: 10.3389/fimmu.2019.02108.
8. Minegishi Y., Saito M., Nagasawa M., Takada H., Hara T., Tsuchiya S., Agematsu K., Yamada M., Kawamura N., Ariga T., Tsuge I., Karasuyama H. Molecular explanation for the contradiction between systemic Th17 defect and localized bacterial infection in hyper-IgE syndrome. *J. Exp. Med.*, 2009, Vol. 206, no. 6, pp. 1291-1301.
9. Minegishi Y., Saito M., Tsuchiya S., Tsuge I., Takada H., Hara T., Kawamura N., Ariga T., Pasic S., Stojkovic O., Metin A., Karasuyama H. Dominant-negative mutations in the DNA-binding domain of STAT3 cause hyper-IgE syndrome. *Nature*, 2007, Vol. 448, no. 7157, pp. 1058-1062.
10. Rose-John S. Interleukin-6 Family Cytokines. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, 2018, Vol. 10, no. 2, a028415. doi: 10.1101/cshperspect.a028415.
11. Schwerd T., Twigg S.R.F., Aschenbrenner D., Manrique S., Miller K.A., Taylor I.B., Capitani M., McGowan S.J., Sweeney E., Weber A., Chen L., Bowness P., Riordan A., Cant A., Freeman A.F., Milner J.D., Holland S.M., Frede N., Müller M., Schmidt-Arras D., Grimbacher B., Wall S.A., Jones E.Y., Wilkie A.O.M., Uhlig H.H. A biallelic mutation in IL6ST encoding the GP130 co-receptor causes immunodeficiency and craniosynostosis. *J. Exp. Med.*, 2017, Vol. 214, no. 9, pp. 2547-2562.
12. Spencer S., Köstel Bal S., Egner W., Allen H.L., Raza S.I., Ma C.A., Gürel M., Zhang Y., Sun G., Sabroe R.A., Greene D., Rae W., Shahin T., Kania K., Ardy R.C., Thian M., Staples E., Pecchia-Bekum A., Worrall W.P.M., Stephens J., Brown M., Tuna S., York M., Shackley F., Kerrin D., Sargur R., Condliffe A., Tipu H.N., Kuehn H.S., Rosenzweig S.D., Turro E., Tavaré S., Thrasher A.J., Jodrell D.I., Smith K.G.C., Boztug K., Milner J.D., Thaventhiran J.E.D. Loss of the interleukin-6 receptor causes immunodeficiency, atopy, and abnormal inflammatory responses. *J. Exp. Med.*, 2019, Vol. 216, no. 9, pp. 1986-1998.
13. Tangye S.G., Pelham S.J., Deenick E.K., Ma C.S. Cytokine-mediated regulation of human lymphocyte development and function: insights from primary immunodeficiencies. *J. Immunol.*, 2017, Vol. 199 (6), pp. 1949-1958.
14. Tsilifis C., Freeman A.F., Gennery A.R. STAT3 Hyper-IgE Syndrome – an Update and Unanswered Questions. *J. Clin. Immunol.*, 2021, Vol. 41, no. 5, pp. 864-880.
15. Zhang Q., Boisson B., Béziat V., Puel A., Casanova J.-L. Human hyper-IgE syndrome: singular or plural? *Mamm. Genome*, 2018, Vol. 29, no. 7-8, pp. 603-617.

Авторы:

Давыдова Н.В. — к.м.н., врач клинической лабораторной диагностики лабораторно-диагностического отделения ГБУЗ «Детская городская клиническая больница № 9 имени Г.Н. Сперанского» Департамента здравоохранения г. Москвы, Москва, Россия

Зиновьева Н.В. — к.м.н., врач — аллерголог-иммунолог, заведующая отделением аллергологии и иммунологии № 1 ГБУЗ «Детская городская клиническая больница № 9 имени Г.Н. Сперанского» Департамента здравоохранения г. Москвы, Москва, Россия

Authors:

Davydova N.V., PhD (Medicine), Doctor of Clinical Laboratory Diagnostics, Laboratory Diagnostic Department, G. Speransky City Children's Hospital No. 9, Moscow, Russian Federation

Zinovieva N.V., PhD (Medicine), Allergist-Immunologist, Head, Department of Allergy and Immunology No. 1, G. Speransky City Children's Hospital No. 9, Moscow, Russian Federation

Сударикова Е.В. — врач — аллерголог-иммунолог
отделения аллергологии и иммунологии № 1 ГБУЗ
«Детская городская клиническая больница № 9 имени
Г.Н. Сперанского» Департамента здравоохранения
г. Москвы, Москва, Россия

Севостьянова Ю.Н. — врач — аллерголог-иммунолог
отделения аллергологии и иммунологии № 1 ГБУЗ
«Детская городская клиническая больница № 9 имени
Г.Н. Сперанского» Департамента здравоохранения
г. Москвы, Москва, Россия

Петрова Ю.В. — врач-педиатр отделения аллергологии
и иммунологии № 1 ГБУЗ «Детская городская
клиническая больница № 9 имени Г.Н. Сперанского»
Департамента здравоохранения г. Москвы, Москва,
Россия

Борисова Т.А. — врач — аллерголог-иммунолог
отделения аллергологии и иммунологии № 1 ГБУЗ
«Детская городская клиническая больница № 9 имени
Г.Н. Сперанского» Департамента здравоохранения
г. Москвы, Москва, Россия

Галеева Е.В. — биолог, заведующая лабораторно-
диагностическим отделением ГБУЗ «Детская городская
клиническая больница № 9 имени Г.Н. Сперанского»
Департамента здравоохранения г. Москвы, Москва,
Россия

Гильдеева Г.Н. — д.фарм.н., профессор, заведующая
кафедрой организации и управления в сфере обращения
лекарственных средств Института профессионального
образования ФГАОУ «Первый Московский
государственный медицинский университет имени
И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ
(Сеченовский Университет), Москва, Россия

Козлов И.Г. — д.м.н., профессор, профессор кафедры
организации и управления в сфере обращения
лекарственных средств Института профессионального
образования ФГАОУ «Первый Московский
государственный медицинский университет имени
И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ
(Сеченовский Университет), Москва, Россия

Sudarikova E.V., Allergist-Immunologist, Department
of Allergology and Immunology No. 1, G. Speransky City
Children's Hospital No. 9, Moscow, Russian Federation

Sevostyanova Yu.N., Allergist-Immunologist, Department
of Allergology and Immunology No. 1, G. Speransky City
Children's Hospital No. 9, Moscow, Russian Federation

Petrova Yu.V., Pediatrician, Department of Allergology and
Immunology No. 1, G. Speransky City Children's Hospital
No. 9, Moscow, Russian Federation

Borisova T.A., Allergist-Immunologist, Department
of Allergology and Immunology No. 1, G. Speransky City
Children's Hospital No. 9, Moscow, Russian Federation

Galeeva E.V., Biologist, Head, Laboratory Diagnostic
Department, G. Speransky City Children's Hospital No. 9,
Moscow, Russian Federation

Gildeeva G.N., PhD, MD (Pharmacy), Professor, Head,
Department of Management and Organization of Drug Supply,
Institute of Professional Education, I. Sechenov First Moscow
State Medical University (Sechenov University), Moscow,
Russian Federation

Kozlov I.G., PhD, MD (Medicine), Professor, Department
of Management and Organization of Drug Supply, Institute
of Professional Education, I. Sechenov First Moscow State
Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian
Federation

Поступила 29.03.2025
Отправлена на доработку 08.04.2025
Принята к печати 25.05.2025

Received 29.03.2025
Revision received 08.04.2025
Accepted 25.05.2025

ПИЩЕВАЯ СЕНСИБИЛИЗАЦИЯ ПРИ КРУГЛОГОДИЧНОМ АЛЛЕРГИЧЕСКОМ РИНИТЕ И БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЕ

Климов А.В.¹, Исаев П.Ю.², Уразова О.И.¹, Климов В.В.¹,
Денисов А.А.¹, Загрешенко Д.С.³, Кухарев Я.В.¹, Худякова М.И.¹,
Шкатова А.Н.⁴, Овчаренко Е.В.¹, Селезнёва О.А.¹, Рыжкова А.Ю.¹

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

² ГБУЗ «Каневская центральная районная больница», станица Каневская, Краснодарский край, Россия

³ Новокузнецкий государственный институт усовершенствования врачей — филиал ФГБОУ ДПО «Российская
медицинская академия непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения РФ,
г. Новокузнецк, Россия

⁴ ОГАУЗ «Межвузовская поликлиника», г. Томск, Россия

Резюме. В настоящее время атопические аллергические болезни (атопии) становятся все более распространенными. Несмотря на разные локализации аллергического воспаления, аллергены, которые вызывают сенсibilизацию человека, могут демонстрировать перекрестный характер, что поднимает вопрос об атопической коморбидности. Сочетание аллергического ринита с пищевой аллергией, так же как и астмы с пищевой аллергией становится все более частым, но при этом все еще остается недостаточно изученным. Целью работы было исследовать пищевую сенсibilизацию при круглогодичном аллергическом рините и астме и установить взаимосвязи между нею и респираторными атопиями, обусловленными преимущественной сенсibilизацией к пылевому клещу *Dermatophagoides pteronissinus*. Обследовано 276 пациентов в возрасте 18-60 лет, обоего пола, с круглогодичным аллергическим ринитом (n = 168) и бронхиальной астмой (n = 108), у которых определены концентрации в крови пяти специфических антител класса IgE к пищевым аллергенам из группы «Большой восьмерки» (G8), а также антитела к важнейшему аллергену *Der p 1* пылевых клещей *Dermatophagoides pteronissinus*, которые являются ведущим источником сенсibilизации при респираторных атопиях. Полученные данные были подвергнуты описательной статистике с учетом формы распределения, расчета непараметрических показателей и корреляций. Все пациенты были разделены на три группы:

Адрес для переписки:

Кухарев Ярослав Викторович
ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский
университет» Министерства здравоохранения РФ
634050, Россия, г. Томск, ул. Московский тракт, 2.
Тел.: 8 (900) 923-84-95.
E-mail: kukharev78@mail.ru

Address for correspondence:

Yaroslav V. Kukharev
Siberian State Medical University
2 Moscow Tract St
Tomsk
634050 Russian Federation
Phone: +7 (900) 923-84-95.
E-mail: kukharev78@mail.ru

Образец цитирования:

А.В. Климов, П.Ю. Исаев, О.И. Уразова, В.В. Климов,
А.А. Денисов, Д.С. Загрешенко, Я.В. Кухарев,
М.И. Худякова, А.Н. Шкатова, Е.В. Овчаренко,
О.А. Селезнёва, А.Ю. Рыжкова «Пищевая
сенсibilизация при круглогодичном аллергическом
рините и бронхиальной астме» // Российский
иммунологический журнал, 2025. Т. 28, № 3. С. 639-644.
doi: 10.46235/1028-7221-17187-FSI

© Климов А.В. и соавт., 2025

Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

A.V. Klimov, P.Yu. Isaev, O.I. Urazova, V.V. Klimov,
A.A. Denisov, D.S. Zagreshenko, Ya.V. Kukharev,
M.I. Khudyakova, A.N. Shkatova, E.V. Ovcharenko,
O.A. Selezneva, A.Yu. Ryzhkova "Food sensitization in
permanent allergic rhinitis and bronchial asthma", Russian
Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii
Zhurnal, 2025, Vol. 28, no. 3, pp. 639-644.
doi: 10.46235/1028-7221-17187-FSI

© Klimov A.V. et al., 2025

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

DOI: 10.46235/1028-7221-17187-FSI

с отсутствием симптомов пищевой аллергии и сенсибилизации (46%), отсутствием клинических проявлений пищевой аллергии, но выявлением скрытой пищевой сенсибилизации (26,1%), наличием и симптомов, и сенсибилизации (27,9%). Таким образом, в более чем половине случаев аллергического ринита и астмы найдена пищевая сенсибилизация. Обнаружена ожидаемая корреляция средней силы между антителами к аллергенам креветки и пылевого клеща. Относительно остальных пищевых аллергенов не выявлена связь с антителами к пылевому клещу. Тем не менее отмечена достоверно большая частота клинической пищевой аллергии при астме по сравнению с аллергическим ринитом, но при суммарном учете субклинической и клинической сенсибилизации достоверной разницы не найдено. Это может свидетельствовать о более надежном поддержании аллергенной толерантности в отношении пищевых аллергенов или недостатку факторов срыва толерантности на доклинической стадии при аллергическом рините по сравнению с астмой.

Ключевые слова: пищевая сенсибилизация, круглогодичный аллергический ринит, бронхиальная астма, коморбидность, пищевые аллергены, пылевые клещи, специфические антитела sIgE

FOOD SENSITIZATION IN PERMANENT ALLERGIC RHINITIS AND BRONCHIAL ASTHMA

Klimov A.V.^a, Isaev P.Yu.^b, Urazova O.I.^a, Klimov V.V.^a, Denisov A.A.^a, Zagreshenko D.S.^c, Kukharev Ya.V.^a, Khudyakova M.I.^a, Shkatova A.N.^d, Ovcharenko E.V.^a, Selezneva O.A.^a, Ryzhkova A.Yu.^a

^a Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation

^b Kanevskaya Central Hospital, Kanevskaya village, Krasnodar Region, Russian Federation

^c Novokuznetsk State Institute for Advanced Medical Studies, Branch of the Russian Academy of Continuous Postgraduate Education, Novokuznetsk, Russian Federation

^d Allergy Unit, Students' Polyclinic, Tomsk, Russian Federation

Abstract. Atopic allergic diseases (atopies) are recently becoming more common. Despite different sites of allergic inflammation, the sensitizing allergens can show cross-reactive effects, which raises the issues of atopic comorbidity. A combination of allergic rhinitis with food allergies, as well as asthma with food allergies, is becoming more frequent, but still not well understood. The aim of the work was to investigate food sensitization in the permanent allergic rhinitis and asthma and to assess relationships between these conditions and respiratory atopies, due to preferential sensitization to the dust mite *Dermatophagoides pteronissinus*. The study included 276 patients aged 18-60 years, both males and females, with perennial allergic rhinitis (n = 168) and bronchial asthma (n = 108). We determined blood concentrations of five specific IgE antibodies to food allergens from G8 group, as well as antibodies to the most significant *Der p 1* allergen of dust mites *Dermatophagoides pteronissinus*, which are the leading source of sensitization in respiratory atopies. The data obtained were processed by descriptive statistics taking into account a distribution, calculation of non-parametric criteria, and correlation indexes. All patients were divided into three groups: (1) free of food allergies and sensitization symptoms (46%), (2) with absent clinical manifestations of food allergies, but latent food sensitization (26.1%), and (3) evidence of both symptoms and proven sensitization (27.9%). Thus, food sensitization was found in more than half of the cases of allergic rhinitis and asthma. An expected moderate correlation has been found between antibodies to shrimp and dust mite allergens. No association of IgE to *Der p 1* with other food allergens was revealed. Meanwhile, a significantly higher frequency of clinical food allergies was found in asthma compared to allergic rhinitis. However, when accounting for a sum of subclinical and clinical sensitization, we did not reveal a significant difference between each other. This result may indicate a more reliable maintenance of allergic tolerance against food allergens, or a lack of factors for ceasing the tolerance condition at preclinical stage in allergic rhinitis, as compared to asthma.

Keywords: food allergy, permanent allergic rhinitis, bronchial asthma, comorbidity, food allergens, housedust mites, specific antibodies sIgA

Сокращения: sIgE — специфические антитела к аллергенам, G8 — «Большая восьмерка» (пищевых аллергенов), *Ara h 2* — аллерген арахиса, *Pen a 1* — аллерген креветки, *Bos d 5* — аллерген коровьего молока, *Gal d 1* — аллерген куриного яйца, *Tri a 19* — аллерген пшеницы, *Der p 1* — аллерген пылевого клеща *Dermatophagoides pteronissinus*.

Введение

Атопические болезни, такие как аллергический ринит и аллергическая бронхиальная астма, развиваются сопряженно или по отдельности на основе полигенно наследуемого состояния — атопической конституции, которая является, наряду с внешними факторами, причиной формирования других коморбидных атопий, например, пищевой аллергии [5]. Пищевая аллергия, аллергический ринит и астма становятся вызовом современной цивилизации, поскольку имеют не только медицинское значение, но оказывают также неблагоприятное воздействие на экономику, производство, образовательный процесс и др. [7].

Целью настоящей работы было исследовать сенсibilизацию пищевыми аллергенами из группы «Большой восьмерки» (G8) при круглогодичном аллергическом рините и астме и установить взаимосвязи между пищевой аллергией и этими респираторными атопиями, обусловленными преимущественной сенсibilизацией к пылевому клещу *Dermatophagoides pteronissinus*.

Материалы и методы

Обследовано 276 пациентов в возрасте 18–60 лет, обоего пола, с круглогодичным аллергическим ринитом ($n = 168$) в легкой и среднетяжелой (к тяжелой) формах и аллергической астмой ($n = 108$), контролируемой, в легкой и среднетяжелой интермиттирующей формах. Все пациенты были разделены на три группы: без пищевой сенсibilизации ($n = 127$; 46%), с субклинической ($n = 72$; 26,1%) и клинически проявляющейся пищевой сенсibilизацией ($n = 77$; 27,9%).

Диагностика респираторных атопий проводилась на основе общепринятых российских и международных согласительных документов в условиях аллергологического и пульмонологического отделений. Повышенное внимание уделялось сбору аллергологического анамнеза и проведению кожных и внутрикожных аллергопроб, которые остаются желательными как следствие проведенной международной дискуссии о роли аллергопроб в начале эпохи молекулярной аллергологии [3]. Пациенты с локальными формами респираторных атопий [6] не включались в работу.

Всем пациентам проводилось компонентное исследование — определение в крови специфических антител класса IgE (sIgE) на пять пищевых аллергенов из группы G8 [2]: *Ara h 2* (арахис), *Pen a 1* (креветка), *Bos d 5* (коровье молоко), *Gal d 1* (куриное яйцо), *Tri a 19* (пшеница), а также на *Der p 1* (пылевой клещ *Dermatophagoides pteronissinus*). Использовался аппарат ImmunoCAP®. Принцип измерения заключается в следующем [1]. Аллергенные компоненты известной специфичности, иммобилизованные на биочипе, реагируют с антителами IgE пациента неизвестной специфичности. Затем добавляется анти-IgE антитела, меченные флюорофором, которые взаимодействуют с комплексами аллерген + IgE с образованием сложных комплексов аллерген + IgE + анти-IgE + флюорофор. После этого производится визуализация с помощью флюоресцентного свечения, которое измеряется лазерным сканером и регистрируется в полуколичественных единицах ISAC Standardized Units (ISU). ISU пересчитываются в концентрации IgE-антител, которые выражаются в kU/L. Вся процедура, включая инкубацию и промывание, длится около 4 часов.

Полученные результаты обрабатывались методами описательной статистики. На предварительном этапе было выявлено, что распределение данных отличалось от гауссовского, поэтому все дальнейшие расчеты проводились непараметрическими методами, в частности: определялись медиана (Me), нижний и верхний квартили ($Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$), устанавливалась достоверность различий по U-критерию (Mann–Whitney), определялся коэффициент корреляции (ρ) с помощью анализа по Spearman. Стандартным уровнем достоверности при статистической обработке считался p -value = 0,05.

Результаты и обсуждение

Как показал клинический контроль, при круглогодичном аллергическом рините у 84 (50%) пациентов не отмечалось симптомов пищевой аллергии, а у 44 (26,2%) хотя симптомов и не было, но была выявлена пищевая сенсibilизация (табл. 1). У 40 (23,8%) пациентов, наряду с симптоматикой ринита, отмечались также проявления пищевой аллергии. Если учесть случаи субклинической и клинически выраженной пищевой сенсibilизации, в итоге в обеих группах она составила 50%.

Как следует из таблицы 1, нет достоверной разницы между содержанием антител к пищевым аллергенам в группах субклинической и клинической сенсibilизаций и по отношению к антителам к пылевому клещу, но вместе с тем тенден-

ТАБЛИЦА 1. ПИЩЕВАЯ СЕНСИБИЛИЗАЦИЯ ПРИ КРУГЛОГОДИЧНОМ АЛЛЕРГИЧЕСКОМ РИНИТЕ (КОНЦЕНТРАЦИИ sIgE В КРОВИ, kU/L), Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

TABLE 1. FOOD SENSITIZATION IN PERENNIAL ALLERGIC RHINITIS (SERUM VALUES OF sIgE, kU/L), Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

Контроль: sIgE < 0,35 (у здоровых лиц для всех sIgE) Control: sIgE < 0,35 (in healthy persons for all antibodies)	Домашний клещ Housedust mite (Dermatophagoides pteroinissinus)	Арахис Peanut (Arachis hypogaea)	Креветка Shrimp (Penaeus aztecus)	Коровье молоко Cow's milk (Bos domesticus)	Куриное яйцо Hen's egg (Gallus domesticus)	Пшеница Wheat (Triticum aestivum)
	p ₁	p ₂	p ₃	p ₄	p ₅	p ₆
Без пищевой сенсibilизации Without food sensitization (n = 84)	Der p 1	Ara h 2	Pen a 1	Bos d 5	Gal d 1	Tri a 19
	1,15 (0,72-1,70)	—	—	—	—	—
Субклиническая пищевая сенсibilизация Subclinical food sensitization (n = 44)	Der p 1	Ara h 2	Pen a 1	Bos d 5	Gal d 1	Tri a 19
	0,96 (0,69-1,30)	0,72 (0,51-0,77)	0,76 (0,63-0,83)	0,55 (0,39-0,71)	0,45 (0,38-0,66)	0,46 (0,39-0,61)
Клиническая пищевая аллергия Clinical food allergy (n = 40)	Der p 1	Ara h 2	Pen a 1	Bos d 5	Gal d 1	Tri a 19
	1,00 (0,71-1,30)	0,88 (0,64-2,04)	1,56 (0,68-3,61)	0,69 (0,40-1,71)	0,65 (0,45-1,41)	1,15 (0,70-2,42)

ТАБЛИЦА 2. ПИЩЕВАЯ СЕНСИБИЛИЗАЦИЯ ПРИ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЕ (КОНЦЕНТРАЦИИ sIgE В КРОВИ, kU/L), Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

TABLE 2. FOOD SENSITIZATION IN BRONCHIAL ASTHMA (SERUM VALUES OF sIgE, kU/L), Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

Контроль: sIgE < 0,35 (у здоровых лиц для всех sIgE) Control: sIgE < 0,35 (in healthy persons for all antibodies)	Домашний клещ Housedust mite (Dermatophagoides pteroinissinus)	Арахис Peanut (Arachis hypogaea)	Креветка Shrimp (Penaeus aztecus)	Коровье молоко Cow's milk (Bos domesticus)	Куриное яйцо Hen's egg (Gallus domesticus)	Пшеница Wheat (Triticum aestivum)
	p ₁	p ₂	p ₃	p ₄	p ₅	p ₆
Без пищевой сенсibilизации Without food sensitization (n = 43)	Der p 1	Ara h 2	Pen a 1	Bos d 5	Gal d 1	Tri a 19
	1,19 (0,72-1,83)	—	—	—	—	—
Субклиническая пищевая сенсibilизация Subclinical food sensitization (n = 28)	Der p 1	Ara h 2	Pen a 1	Bos d 5	Gal d 1	Tri a 19
	1,31 (0,97-2,09)	0,76 (0,72-0,84)	0,76 (0,71-0,90)	0,48 (0,37-0,69)	0,48 (0,37-0,70)	0,45 (0,37-0,51)
Клиническая пищевая аллергия Clinical food allergy (n = 37)	Der p 1	Ara h 2	Pen a 1	Bos d 5	Gal d 1	Tri a 19
	1,31 (1,06-2,03)	0,83 (0,67-2,30)	0,70 (0,55-3,61)	0,67 (0,37-1,12)	0,60 (0,39-0,83)	0,71 (0,51-2,00)

ция к повышению всех sIgE имеется. Проведение корреляционного анализа выявило связь средней силы между антителами к аллергену креветки и пылевого клеща ($\rho = 0,32$; $p < 0,05$) при клинической сенсibilизации. Эта связь ожидаема и известна из литературных источников [4].

При клинической оценке пациентов с бронхиальной астмой у 42 (38,9%) не отмечалось симптомов пищевой аллергии, а у 28 (25,9%) хотя симптомов и не было, но была выявлена пищевая сенсibilизация (табл. 2). У 37 (34,3%) пациентов, наряду с симптоматикой астмы, отмечались также проявления пищевой аллергии. Если учесть случаи субклинической и клинически выраженной пищевой сенсibilизации, суммарно в обеих группах она составила 60,2%, что показывает недостоверную тенденцию более высокой частоты по сравнению с показателем при аллергическом рините ($z = 1,66$, $p > 0,05$). Однако если учесть только случаи пищевой аллергии при аллергическом рините и астме, то частота клинической пищевой сенсibilизации при астме оказывается достоверно выше ($z = -1,97$; $p < 0,05$), чем при рините. Получается, что не все пациенты с субклинической сенсibilизацией являются кандидатами на развитие клинической пищевой аллергии, но при астме в большей степени. Другими словами, срыв аллергической толерантности при астме более вероятен, чем при аллергическом рините.

Как видно из таблицы 2, при астме не выявлены достоверные различия между группами субклинической и клинической пищевой сенсibilизации по отношению к пылевому клещу. Однако тенденция к повышению для всех sIgE имела. При проведении корреляционного анализа также отмечена связь средней силы на уровне клинической сенсibilизации между sIgE к креветке и пылевому клещу ($\rho = 0,41$; $p < 0,05$).

Заключение

Проведенные нами исследования и расчеты показывают высокий уровень пищевой аллергии и субклинической сенсibilизации как атопической коморбидности при круглогодичном аллергическом рините и аллергической астме. Выявлена связь средней силы между антителами к аллергенам креветки и пылевого клеща, что может быть обусловлено генетической близостью двух видов в процессе эволюционного развития. Содержание sIgE к ведущим пищевым аллергенам из группы G8 при субклинической сенсibilизации и клинической аллергии не отличается достоверно, хотя демонстрирует тенденцию к повышению. Отмечена достоверно большая частота клинической пищевой аллергии при астме по сравнению с аллергическим ринитом, но при суммарном учете субклинической и клинической сенсibilизации достоверной разницы не найдено. Это может свидетельствовать о более надежном поддержании аллергической толерантности в отношении пищевых аллергенов или недостатку факторов срыва толерантности на доклинической стадии при аллергическом рините по сравнению с астмой. Все это предполагает желательность возвращения к данной работе через определенный период времени для целевого исследования пациентов с субклинической пищевой сенсibilизацией.

Выводы:

1. Пищевая сенсibilизация регистрируется более чем в половине случаев круглогодичного аллергического ринита и астмы.
2. При данных респираторных атопиях в 27,9% наблюдается сочетание пищевой сенсibilизации с клиническими симптомами пищевой аллергии.
3. Можно предположить, что при аллергическом рините отмечается более надежная оральная толерантность, чем при астме.

Список литературы / References

1. ImmunoCAP ISAC 112 for multiplex allergen testing. Available at: <https://www.nice.org.uk/guidance/dg24/resources/immunocap-isac-112-for-multiplex-allergen-testing-pdf-1053690256069>.
2. Klimov V.V. Textbook of Allergen Tolerance. Cham: Springer, 2022. 325 p.
3. Larenas-Linnemann D., Luna-Pech J.A., Mösges R. Debates in Allergy Medicine: Allergy skin testing cannot be replaced by molecular diagnosis in the near future. *World Allergy Organ. J.*, 2017, Vol. 10, no. 1, 32. doi: 10.1186/s40413-017-0164-1.
4. Sarwar M. House dust mites: ecology, biology, prevalence, epidemiology and elimination. In: Pacheco G.A.B., Kamboh A.A. (eds.). *Parasitology and Microbiology Research*. London: IntechOpen, 2020. doi: 10.5772/intechopen.91891.
5. Sicherer S.H., Dampson H.A. Food allergy: A review and update on epidemiology, pathogenesis, diagnosis, prevention, and management. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2018, Vol. 141, no. 1, pp. 41-58.

6. Testera-Montes A., Salas M., Palomares F., Ariza A., Torres M.J., Rondón C., Eguiluz-Gracia I. Local respiratory allergy: from rhinitis phenotype to disease spectrum. *Front. Immunol.*, 2021, Vol. 12, 691964. doi: 10.3389/fimmu.2021.691964.

7. Wasserman S., Beegin P., Watson W. IgE-mediated food allergy. *Allergy Asthma Clin. Immunol.*, 2018, Vol. 14, no. 2, pp. 71-81.

Авторы:

Климов А.В. — к.м.н., доцент, доцент кафедры иммунологии и аллергологии ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Томск, Россия

Исаев П.Ю. — главный врач ГБУЗ «Каневская центральная районная больница», станица Каневская, Краснодарский край, Россия

Уразова О.И. — д.м.н., профессор, член-корр. РАН, заведующая кафедрой патофизиологии ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Томск, Россия

Климов В.В. — д.м.н., профессор, заведующий кафедрой иммунологии и аллергологии ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Томск, Россия

Денисов А.А. — д.м.н., профессор кафедры иммунологии и аллергологии ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Томск, Россия

Загрешенко Д.С. — к.м.н., доцент кафедры клинической лабораторной диагностики Новокузнецкого государственного института усовершенствования врачей — филиала ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения РФ, г. Новокузнецк, Россия

Кухарев Я.В. — к.м.н., ассистент кафедры иммунологии и аллергологии ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Томск, Россия

Худякова М.И. — руководитель Исследовательского центра коллективного пользования ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Томск, Россия

Шкатова А.Н. — к.м.н., заведующая аллергологическим отделением ОГАУЗ «Межвузовская поликлиника», г. Томск, Россия

Овчаренко Е.В. — лаборант-исследователь кафедры иммунологии и аллергологии ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Томск, Россия

Селезнева О.А. — студент педиатрического факультета ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Томск, Россия

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

Authors:

Klimov A.V., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Immunology and Allergology, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation

Isaev P.Yu., Head, Kanevskaya Central Hospital, Kanevskaya village, Krasnodar Region, Russian Federation

Urazova O.I., PhD, MD (Medicine), Professor, Corresponding Member, Russian Academy of Sciences, Head, Department of Pathological Physiology, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation

Klimov V.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Immunology and Allergology, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation

Denisov A.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Immunology and Allergology, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation

Zagreshenko D.S., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Clinical Laboratory Diagnostics, Novokuznetsk State Institute for Advanced Medical Studies, Branch of the Russian Academy of Continuous Postgraduate Education, Novokuznetsk, Russian Federation

Kukharev Ya.V., PhD (Medicine), Assistant Professor, Department of Immunology and Allergology, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation

Khudiakova M.I., Head, Research Center for Shared Equipment Use, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation

Shkatova A.N., PhD (Medicine), MD, Head, Allergy Unit, Students' Polyclinic, Tomsk, Russian Federation

Ovcharenko E.V., Laboratory Researcher, Department of Immunology and Allergology, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation

Selezneva O.A., Student, Pediatric Faculty, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation

Ryzhkova A.Yu., Student, Medical Biological Faculty, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation

Поступила 29.03.2025

Отправлена на доработку 11.05.2025

Принята к печати 31.05.2025

Received 29.03.2025

Revision received 11.05.2025

Accepted 31.05.2025

ВЫСОКОЧУВСТВИТЕЛЬНЫЙ МУЛЬТИПЛЕКСНЫЙ АНАЛИЗ ИНТЕРЛЕЙКИНОВ В КОНДЕНСАТЕ ВЫДЫХАЕМОГО ВОЗДУХА У ДЕТЕЙ С БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ: ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ IL-13 И IL-17A

Смольникова М.В., Горбачева Н.Н., Терещенко С.Ю.

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

Резюме. Интерлейкины играют ключевую роль в формировании различных эндотипов бронхиальной астмы, что определяет особенности клинического течения заболевания и эффективность терапии. Конденсат выдыхаемого воздуха (КВВ) представляет собой перспективный неинвазивный материал для оценки локального воспаления дыхательных путей при бронхиальной астме, однако данные о возможности определения цитокинов в КВВ у детей ограничены. Цель исследования — установить возможность детекции и диагностическую значимость IL-4, IL-5, IL-13 и IL-17A в КВВ у детей с бронхиальной астмой с использованием высокочувствительного мультиплексного анализа. Обследовано 169 детей в возрасте 6-17 лет (104 с бронхиальной астмой и 65 здоровых). КВВ собирали с помощью RTube (Respiratory Research, США), проводили концентрирование образцов и определяли уровни интерлейкинов методом мультиплексного анализа на платформе MAGPIX (Luminex, США). Анализ концентраций интерлейкинов в КВВ показал, что у детей с БА наблюдаются статистически значимые изменения по сравнению с контрольной группой. У детей с астмой выявлено значимое повышение частоты детекции IL-13 (53,9% против 30,8%, $p = 0,003$) и IL-17A (57,7% против 27,7%, $p = 0,001$) по сравнению с контролем. Частота выявления этих цитокинов прогрессивно увеличивалась с нарастанием тяжести заболевания, достигая для IL-13 72,7% и для IL-17A 63,6% при тяжелой астме. Полученные результаты демонстрируют возможность детекции ключевых цитокинов в КВВ у детей с БА использованием высокочувствительного мультиплексного анализа после предварительного концентрирования образцов. Определение IL-13 и IL-17A в КВВ может рассматриваться как потенциальный неинвазивный биомаркер тяжести бронхиальной астмы у детей. Для внедрения метода в клиническую практику необходимы дальнейшие исследования с большим количеством пациентов и стандартизация процедуры концентрирования образцов. Полученные данные демонстрируют перспективность использования КВВ для неинвазивной оценки локального воспаления дыхательных путей у детей с БА.

Ключевые слова: бронхиальная астма, дети, конденсат выдыхаемого воздуха, мультиплексный анализ, IL-13, IL-17A

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: smarinv@yandex.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: smarinv@yandex.ru

Образец цитирования:

М.В. Смольникова, Н.Н. Горбачева, С.Ю. Терещенко
«Высокочувствительный мультиплексный анализ
интерлейкинов в конденсате выдыхаемого воздуха
у детей с бронхиальной астмой: диагностическая
значимость IL-13 и IL-17A» // Российский
иммунологический журнал, 2025. Т. 28, № 3. С. 645-650.
doi: 10.46235/1028-7221-17272-HSM

© Смольникова М.В. и соавт., 2025
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

M.V. Smolnikova, N.N. Gorbacheva, S.Yu. Tereshchenko
“Highly sensitive multiplex assay of interleukins in exhaled
breath condensate from children with bronchial asthma:
Diagnostic significance of IL-13 and IL-17A”, Russian Journal
of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2025,
Vol. 28, no. 3, pp. 645-650.
doi: 10.46235/1028-7221-17272-HSM

© Smolnikova M.V. et al., 2025
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.46235/1028-7221-17272-HSM

HIGHLY SENSITIVE MULTIPLEX ASSAY OF INTERLEUKINS IN EXHALED BREATH CONDENSATE FROM CHILDREN WITH BRONCHIAL ASTHMA: DIAGNOSTIC SIGNIFICANCE OF IL-13 AND IL-17A

Smolnikova M.V., Gorbacheva N.N., Tereshchenko S.Yu.

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

Abstract. Interleukins play a key role in development of bronchial asthma endotypes, thus determining individual clinical course of the disease and the efficiency of therapy. Exhaled breath condensate (EBC) represents a promising non-invasive biomaterial for assessing local airway inflammation in asthma. Only limited data exist on the opportunity of cytokines detection in EBC of pediatric patients. The aim of our study was to assess the opportunity of detection and diagnostic significance of IL-4, IL-5, IL-13, and IL-17A in EBC of children with asthma using high-sensitivity multiplex analysis. The study included 169 children aged 6-17 years (104 with asthma and 65 healthy controls). EBC was collected using RTube (Respiratory Research, USA), samples were concentrated, and interleukin levels were determined by multiplex analysis on the MAGPIX (Luminex, USA) platform. Analysis of interleukins in exhaled air condensate showed that children with bronchial asthma exhibit statistically significant changes compared to the control group. Children with asthma showed significantly increased detection rates of IL-13 (53.9% vs 30.8%, $p = 0.003$) and IL-17A (57.7% vs 27.7%, $p = 0.001$) compared to controls. The detection frequency of these cytokines progressively increased with disease severity, reaching 72.7% for IL-13 and 63.6% for IL-17A in severe asthma. Our results demonstrate the possibility of detecting key cytokines in exhaled air condensate in children with bronchial asthma using highly sensitive multiplex analysis after prior concentration of samples. Detection of IL-13 and IL-17A in EBC can be considered a potential non-invasive biomarker of asthma severity in children. However, further studies with larger patient populations and standard sample concentration technique are required for clinical implementation of the method. These data demonstrate a promise for usage of EBC for non-invasive assessment of local airway inflammation in children with bronchial asthma.

Keywords: asthma, children, exhaled breath condensate, multiplex analysis, IL-13, IL-17A

Работа выполнена в рамках поискового научного исследования «Разработка технологий оценки факторов риска и маркеров неконтролируемого течения бронхиальной астмы у детей» (№ 1024070500020-3-3.2.3), выполняемой в НИИ медицинских проблем Севера ФИЦ КНЦ СО РАН в 2024-2026 гг.

Введение

Конденсат выдыхаемого воздуха (КВВ) — это жидкость, собранная из паров выдыхаемого воздуха, содержит широкий спектр разнообразных растворимых молекул, представляющих собой сложную смесь, которая состоит в основном из водяного пара, а также органических соединений, медиаторов воспаления и других биомолекул, отражающих состояние дыхательной системы. КВВ привлек значительное внимание в медицинских исследованиях как неинвазивный инструмент диагностики респираторных заболеваний, предоставляющий важные данные о воспалении дыха-

тельных путей, окислительном стрессе и общем состоянии дыхательных путей [10, 13].

Метод был впервые предложен в 1980 году, но впоследствии приоритет Российской фундаментальной медицины в исследовании КВВ был утерян [1]. Существенную роль для продвижения методики анализа КВВ в научные исследования и клиническую практику сыграли опубликованные в 2005 году рекомендации Европейской респираторной ассоциации по стандартизации подходов к сбору и аналитике КВВ [4]. Широкое внедрение метода может существенно повлиять на лечение респираторных заболеваний и результаты лечения пациентов, что делает анализ КВВ одним из основных направлений в поиске инновационных неинвазивных диагностических стратегий.

Преимущества методики оценки КВВ заключаются в том, что сбор конденсата абсолютно неинвазивен, требует только спокойного дыхания в охлаждаемый конденсатор, не требует седации. Конденсат в основном продуцируется в мелких дыхательных путях и альвеолах, фактиче-

ски обеспечивая биохимический снимок нижних дыхательных путей, кроме этого методика КВВ позволяет повторять оценку режиме реального времени, что полезно для диагностики, мониторинга прогрессирования заболевания, определения фенотипа и реакции на лечение. И, поскольку сбор КВВ включает в себя обычное дыхание без принудительных маневров, он легче переносится пациентами с дыхательной недостаточностью и может быть использован у детей, включая грудной возраст.

Однако исследования КВВ не лишены недостатков. Такие проблемы, как вариабельность методов сбора, потенциальное загрязнение слюной и отсутствие стандартизированных протоколов анализа, вызывают опасения относительно надежности КВВ как диагностического инструмента. Для преодоления этих возможных недостатков необходимо строго придерживаться соответствующих рекомендаций Европейского респираторного общества [4].

На сегодняшний день выполнено множество исследований, посвященных анализу разнообразных маркеров в КВВ при различных заболеваниях бронхолегочной системы у детей и взрослых [3, 5, 6, 8, 9, 14].

Функционирование интерлейкинов, в частности, IL-4, IL-5, IL-13 и IL-17, крайне важно в формировании различных эндотипов бронхиальной астмы (БА) у детей и определяет особенности клинического течения заболевания, а также эффективность терапии. Основными медиаторами Th2-опосредованного воспаления при БА являются IL-4 и IL-13: они запускают синтез IgE, вызывают гиперплазию бокаловидных клеток и усиливают секрецию слизи. IL-5 отвечает за созревание, активацию эозинофилов в дыхательных путях — это характерно для классического аллергического фенотипа астмы [7]. Продуцируемый Th17-клетками IL-17 участвует в развитии нейтрофильного воспаления и ремоделировании дыхательных путей, что часто ассоциируется с более тяжелым течением заболевания и резистентностью к стероидной терапии [11]. Анализ профиля этих цитокинов позволяет идентифицировать конкретный эндотип астмы у ребенка, а также прогнозировать течение заболевания и оптимизировать выбор таргетной терапии, что крайне важно при тяжелых формах БА. К настоящему времени данные о возможности детекции и диагностической значимости содержания цитокинов в КВВ у детей ограничены.

В связи с вышеперечисленным **целью** настоящего исследования было установить возможность детекции и диагностической значимости IL-4, IL-5, IL-13 и IL-17 в КВВ у детей с БА высокочувствительным методом мультиплексного

анализа с попыткой преодоления проблемы высокого разведения биомаркеров КВВ путем предварительного концентрирования образцов.

Материалы и методы

В исследование было включено 169 детей в возрасте от 6 до 17 лет: 104 ребенка с верифицированным диагнозом «БА» и 65 практически здоровых детей без анамнеза атопии или хронических бронхолегочных заболеваний, сформировавших контрольную группу. Диагностика и оценка тяжести астмы проводились согласно рекомендациям Global Initiative for Asthma (2021) [2]. Протокол исследования получил одобрение Этического комитета Федерального исследовательского центра — Красноярского научного центра СО РАН. КВВ собирали с помощью устройства RTube Exhaler Breath Condensate Collector (Respiratory Research, США) и хранили при -80°C до анализа.

Образцы КВВ проанализированы на наличие контаминации слюной с помощью иммуноферментного анализа концентрации альфа-амилазы (2 образца, которые дали положительные результаты, исключили из исследования). Перед анализом проводили концентрирование образцов в 40-50 раз с помощью вакуумного концентратора с охлаждением (CentriVap, Labconco, США).

Измерение уровней IL-4, IL-5, IL-13 и IL-17A проводили методом мультиплексного иммуноанализа на магнитных частицах (анализатор MAGPIX, Luminex, США; тест-система MILLIPLEX® Human High Sensitivity T Cell Magnetic Bead Panel, HSTCMAG-28SK, Германия), а преобразование сигналов в абсолютные концентрации выполняли в Milliplex Analyst (Luminex Corp, США) по протоколу производителя.

Статистическую обработку данных выполняли в IBM SPSS Statistics for Windows v. 26.0 (IBM Corp., США); количественные показатели представлены медианой и интерквартильным размахом — Me ($Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$), а для сравнения групп использовали критерий χ^2 Пирсона, двусторонний точный тест Фишера и U-критерий Манна–Уитни.

Результаты и обсуждение

В таблице 1 представлены данные концентрации и частоты детекции IL-4, IL-5, IL-13, IL-17A в КВВ у детей с БА и в контрольной группе. В таблице 2 показаны частоты детекции интерлейкинов у детей с различной степенью тяжести БА.

Показано, что у детей с БА наблюдаются статистически значимые изменения концентраций интерлейкинов в КВВ по сравнению с контрольной группой (табл. 1). Концентрации IL-4 и IL-5 были низкими и не показали статистически зна-

чимых различий между группами ($p = 0,149$ и $p = 0,670$ соответственно). Однако для IL-13 медиана концентрации составила 0,01 пг/мл у детей с БА по сравнению с 0,00 пг/мл в контрольной группе ($p = 0,015$), а частота детекции увеличилась с 30,8% до 53,9% ($p = 0,003$). Для IL-17A медиана концентрации составила 0,04 пг/мл у детей с БА, что также значительно выше, чем в контрольной группе (0,00 пг/мл, $p = 0,001$), а частота детекции возросла с 27,7% до 57,7% ($p = 0,001$).

Измерение частоты детекции интерлейкинов в зависимости от степени тяжести БА показало, что с увеличением тяжести заболевания частота детекции IL-13 и IL-17A возрастает (табл. 2). Для IL-4 и IL-5 не было выявлено статистически значимых различий между группами с различной степенью тяжести БА и контрольной группой. В то же время частота детекции IL-13 ($> 0,23$ пг/мл) увеличилась с 30,8% в контрольной группе до 72,7% у детей с тяжелой БА ($p = 0,015$). Для IL-17A частота детекции ($> 0,33$ пг/мл) составила

27,7% в контрольной группе и 63,6% у детей с тяжелой БА ($p = 0,034$).

Полученные результаты показывают возможность детекции цитокинов в КВВ у детей с БА с использованием высокочувствительного мультиплексного анализа, однако требуется предварительное концентрирование образцов. Полученные нами данные о крайне низких концентрациях цитокинов в КВВ, не превышающих 1 пг/мл, согласуются с ранее опубликованными результатами Stiegel M.A. et al., что подтверждает методологическую корректность проведенного исследования [12].

Отдельный интерес представляет показанное нами статистически значимое повышение частоты детекции IL-13 и IL-17A у детей с БА по сравнению с контрольной группой, а также прогрессивное увеличение частоты их выявления с нарастанием тяжести заболевания. Эти обнаружения соответствуют современным представлениям о патогенезе астмы, где IL-13 играет

ТАБЛИЦА 1. КОНЦЕНТРАЦИИ И ЧАСТОТЫ ДЕТЕКЦИИ ВЫШЕ НИЖНЕГО ПРЕДЕЛА КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ИЗУЧЕННЫХ ИНТЕРЛЕЙКИНОВ В КОНДЕНСАТЕ ВЫДЫХАЕМОГО ВОЗДУХА В ГРУППЕ КОНТРОЛЯ И У ДЕТЕЙ С БА (ПГ/МЛ; N, %)

TABLE 1. CONCENTRATIONS AND DETECTION FREQUENCIES ABOVE THE LOWER LIMIT OF QUANTITATIVE DETERMINATION OF THE STUDIED INTERLEUKINS IN EXHALED AIR CONDENSATE IN THE CONTROL GROUP AND IN CHILDREN WITH ASTHMA (PG/ML; N, %)

Интерлейкины Interleukins	Контроль Control n = 65	Астма Asthma n = 104	p
IL-4, концентрация, пг/мл IL-4, concentration, pg/mL	0,00 (0,00-0,38) [0,00-3,62]	0,38 (0,00-0,38) [0,00-3,62]	0,149
IL-4, частота детекции $> 1,12$ пг/мл IL-4, detection rate > 1.12 pg/mL	28 (43,1%)	57 (54,8%)	0,138
IL-5, концентрация, пг/мл IL-5, concentration, pg/mL	0,00 (0,00-0,01) [0,00-0,06]	0,00 (0,00-0,01) [0,00-0,04]	0,670
IL-5, частота детекции $> 0,12$ пг/мл IL-5, detection rate > 0.12 pg/mL	17 (26,2%)	31 (29,8%)	0,608
IL-13, концентрация, пг/мл IL-13, concentration, pg/mL	0,00 (0,00-0,01) [0,00-1,83]	0,01 (0,00-0,01) [0,00-0,13]	0,015
IL-13, частота детекции $> 0,23$ пг/мл IL-13, detection rate > 0.23 pg/mL	20 (30,8%)	56 (53,9%)	0,003
IL-17A, концентрация, пг/мл IL-17A, concentration, pg/mL	0,00 (0,00-0,04) [0,00-0,21]	0,04 (0,00-0,04) [0,00-0,28]	0,001
IL-17A, частота детекции $> 0,33$ пг/мл IL-17A, detection rate > 0.33 pg/mL	18 (27,7%)	60 (57,7%)	0,001

Примечание. p – значения по U-тесту Манна–Уитни и тесту Пирсона χ^2 . Данные представлены в виде медианы (интерквартильного размаха) [Min-Max].

Note. p, values according to the Mann–Whitney U-test and the Pearson test χ^2 . The data is presented as the median (interquartile range) [Min-Max].

ТАБЛИЦА 2. ЧАСТОТЫ ДЕТЕКЦИИ ИЗУЧЕННЫХ ИНТЕРЛЕЙКИНОВ ВЫШЕ НИЖНЕГО ПРЕДЕЛА КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ В КОНДЕНСАТЕ ВЫДЫХАЕМОГО ВОЗДУХА У ДЕТЕЙ С РАЗЛИЧНОЙ СТЕПЕНЬЮ ТЯЖЕСТИ БА (N, %)

TABLE 2. DETECTION FREQUENCIES OF THE STUDIED INTERLEUKINS ABOVE THE LOWER LIMIT OF QUANTITATIVE DETERMINATION IN EXHALED AIR CONDENSATE IN CHILDREN WITH VARYING DEGREES OF ASTHMA SEVERITY (N, %)

Интерлейкины Interleukins	Контроль Control (n = 65)	Легкая БА Mild bronchial asthma (n = 58)	Среднетяжелая БА Moderate bronchial asthma (n = 35)	Тяжелая БА Severe bronchial asthma (n = 11)	p
	0	1	2	3	
IL-4 (> 1,12 пг/мл) IL-4 (> 1.12 pg/mL)	28 (43,1%)	35 (60,3%)	16 (45,7%)	6 (54,6%)	
IL-5 (> 0,12 пг/мл) IL-5 (> 0.12 pg/mL)	17 (26,2%)	20 (34,5%)	9 (25,7%)	2 (18,2%)	
IL-13 (> 0,23 пг/мл) IL-13 (> 0.23 pg/mL)	20 (30,8%)	32 (55,2%)	16 (45,7%)	8 (72,7%)	p ₀₋₁ = 0,010 p ₀₋₃ = 0,015
IL-17A (> 0,33 пг/мл) IL-17A (> 0.33 pg/mL)	18 (27,7%)	30 (51,7%)	23 (65,7%)	7 (63,6%)	p ₀₋₁ = 0,009 p ₀₋₂ < 0,001 p ₀₋₃ = 0,034

Примечание. Использован двусторонний точный тест Фишера; представлены только значения p < 0,05.

Note. A two-sided accurate Fischer test was used; only values of p < 0.05 are presented.

ключевую роль в развитии аллергического воспаления и гиперреактивности дыхательных путей, а IL-17A ассоциирован с более тяжелым течением заболевания и стероидной резистентностью [11]. Отсутствие значимых различий в концентрациях IL-4 и IL-5 между группами может указывать на особенности локальной продукции этих цитокинов, их быстрой деградации в дыхательных путях или техническими ограничениями метода детекции даже после концентрирования образцов.

Заключение

Представленные результаты позволяют рассматривать IL-13 и IL-17A в КВВ как потенциальные неинвазивные биомаркеры тяжести БА у

детей, что прежде всего важно для мониторинга течения заболевания и оптимизации терапии. Тем не менее для внедрения метода в клиническую практику требуются дополнительные исследования на значительно более крупной когорте пациентов, стандартизация процедуры концентрирования образцов и определение четких пороговых значений для различных фенотипов астмы. Ограничением исследования является относительно небольшое количество пациентов с тяжелой астмой, что требует осторожности при интерпретации результатов для этой подгруппы. Тем не менее полученные данные демонстрируют перспективность использования КВВ для неинвазивной оценки локального воспаления дыхательных путей у детей с БА.

Список литературы / References

1. Сидоренко Г.И., Зборовский Э.И., Левина Д.И. Поверхностно-активные свойства конденсата выдыхаемого воздуха (новый способ исследования функций легких) // Терапевтический архив, 1980. Т. 53, № 3. С. 65-68. [Sidorenko G.I., Zborovskii E.I., Levina D.I. Surface-active properties of the exhaled air condensate (a new method of studying lung function). *Terapevticheskiy arkhiv = Therapeutic Archive*, 1980, Vol. 52, no. 3, pp. 65-68. (In Russ.)]
2. Global Asthma Report 2021. Global Asthma Network. Available at: <https://ginasthma.org/wp-content/uploads/2021/05/GINA-Main-Report-2021-V2-WMS.pdf>.
3. Hao W., Li M., Zhang C., Zhang Y., Wang P. Inflammatory mediators in exhaled breath condensate and peripheral blood of healthy donors and stable COPD patients. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.*, 2019, Vol. 41, no. 2, pp. 224-230.
4. Horváth I., Hunt J., Barnes P.J., Alving K., Antczak A., Baraldi E., Becher G., Van Beurden W.J., Corradi M., Dekhuijzen R., Dweik R.A., Dwyer T., Effros R., Erzurum S., Gaston B., Gessner C., Greening A., Ho L.P., Hohlfeld J., Jöbsis Q., Laskowski D., Loukides S., Marlin D., Montuschi P., Olin A.C., Redington A.E., Reinhold P., van Rensen E.L., Rubinstein I., Silkoff P., Toren K., Vass G., Vogelberg C., Wirtz H. Exhaled breath condensate: methodological recommendations and unresolved questions. *Eur. Respir. J.*, 2005, Vol. 26, no. 3, pp. 523-548.
5. Kasule G.W., Hermans S., Semugenze D., Wekiya E., Nsubuga J., Mwachan P., Kabugo J., Joloba M., García-Basteiro A.L., Ssengooba W. Non-sputum-based samples and biomarkers for detection of Mycobacterium

tuberculosis: the hope to improve childhood and HIV-associated tuberculosis diagnosis. *Eur J. Med. Res.*, 2024, Vol. 29, no. 1, 502. doi: 10.1186/s40001-024-02092-z.

6. Kita K., Gawinowska M., Chełmińska M., Niedoszytko M. The Role of Exhaled Breath Condensate in Chronic Inflammatory and Neoplastic Diseases of the Respiratory Tract. *Int J. Mol Sci.*, 2024, Vol. 25, no. 13, 7395. doi: 10.3390/ijms25137395.

7. Maison N., Omony J., Illi S., Thiele D., Skevaki C., Dittrich A.M., Bahmer T., Rabe K.F., Weckmann M., Happle C., Schaub B., Meyer M., Foth S., Rietschel E., Renz H., Hansen G., Kopp M.V., Von Mutius E., Grychtol R., Fuchs O., Roesler B., Welcherling N., Kohistani-Greif N., Kurz J., Landgraf-Rauf K., Laubhahn K., Liebl C., Ege M., Hose A., Zeitlmann E., Berbig M., Marzi C., Schaubberger C., Zissler U., Schmidt-Weber C., Ricklefs I., Diekmann G., Liboschik L., Voigt G., Sultansei L., Nissen G., König I.R., Kirsten A.M., Pedersen F., Watz H., Waschki B., Herzmann C., Abdo M., Biller H., Gaede K.I., Bovermann X., Steinmetz A., Husstedt B.L., Nitsche C., Veith V., Szewczyk M., Brinkmann F., Malik A., Schwerk N., Dopfer C., Price M., Jirmo A.C., Habener A., Deluca D.S., Gaedcke S., Liu B., Calveron M.R., Weber S., Schildberg T., Van Koningsbruggen-Rietschel S., Alcazar M. T2-high asthma phenotypes across lifespan. *Eur. Respir. J.*, 2022, Vol. 60, no. 3, 2102288. doi: 10.1183/13993003.02288-2021.

8. Montesi S.B., Mathai S.K., Brenner L.N., Gorshkova I.A., Berdyshev E.V., Tager A.M., Shea B.S. Docosatetraenoyl LPA is elevated in exhaled breath condensate in idiopathic pulmonary fibrosis. *BMC Pulm. Med.*, 2014, Vol. 14, 5. doi: 10.1186/1471-2466-14-5.

9. Nessen E., Toussaint B., Israëls J., Brinkman P., Maitland-Van Der Zee A.H., Haarman E. The non-invasive detection of pulmonary exacerbations in disorders of mucociliary clearance with breath analysis: a systematic review. *J. Clin. Med.*, 2024, Vol. 13, no. 12, 3372. doi: 10.3390/jcm13123372.

10. Pleil J.D., Wallace M.A.G., Madden M.C. Exhaled breath aerosol (EBA): the simplest non-invasive medium for public health and occupational exposure biomonitoring. *J. Breath Res.*, 2018, Vol. 12, no. 2, 027110. doi: 10.1088/1752-7163/aa9855.

11. Steinke J.W., Lawrence M.G., Teague W.G., Braciale T.J., Patrie J.T., Borish L. Bronchoalveolar lavage cytokine patterns in children with severe neutrophilic and paucigranulocytic asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2021, Vol. 147, no. 2, pp. 686-693.

12. Stiegel M.A., Pleil J.D., Sobus J.R., Morgan M.K., Madden M.C. Analysis of inflammatory cytokines in human blood, breath condensate, and urine using a multiplex immunoassay platform. *Biomarkers*, 2015, Vol. 20, no. 1, pp. 35-46.

13. Szunerits S., Dörfler H., Pagneux Q., Daniel J., Wadekar S., Woitrain E., Ladage D., Montaigne D., Boukherroub R. Exhaled breath condensate as bioanalyte: from collection considerations to biomarker sensing. *J. Anal. Bioanal. Chem.*, 2023, Vol. 415, no. 1, pp. 27-34.

14. Thomas P.S., Lowe A.J., Samarasinghe P., Lodge C.J., Huang Y., Abramson M.J., Dharmage S.C., Jaffe A. Exhaled breath condensate in pediatric asthma: promising new advance or pouring cold water on a lot of hot air? A systematic review. *J. Pediatr. Pulmonol.*, 2013, Vol. 48, no. 5, pp. 419-442.

Авторы:

Смольников М.В. — к.б.н., руководитель группы молекулярно-генетических исследований, ведущий научный сотрудник Научно-исследовательского института медицинских проблем Севера — обособленного подразделения ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук», г. Красноярск, Россия

Горбачева Н.Н. — старший научный сотрудник клинического отделения соматического и психического здоровья детей Научно-исследовательского института медицинских проблем Севера — обособленного подразделения ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук», г. Красноярск, Россия

Терещенко С.Ю. — д.м.н., профессор, заведующий клиническим отделением соматического и психического здоровья детей Научно-исследовательского института медицинских проблем Севера — обособленного подразделения 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 Researcher, Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk Research Center, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Krasnoyarsk, Russian Federation

Gorbacheva N.N., Senior Researcher, Clinical Department of Somatic and Mental Health of Children, Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk Research Center, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Krasnoyarsk, Russian Federation

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 Research Center, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Krasnoyarsk, Russian Federation

Поступила 12.05.2025
Принята к печати 25.05.2025

Received 12.05.2025
Accepted 25.05.2025

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ КАК РАННИЙ МАРКЕР ИНФЕКЦИОННОГО ВОСПАЛЕНИЯ ПРИ ОСТРОМ ПАНКРЕАТИТЕ

**Пивоварова Л.П., Арискина О.Б., Осипова И.В., Демко А.Е.,
Рысева А.А., Громов М.И., Малькова В.М., Маркелова Е.В.**

*ГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт скорой помощи имени И.И. Джанелидзе»,
Санкт-Петербург, Россия*

Резюме. Известно, что острый панкреатит — это первоначально асептическое воспаление поджелудочной железы. Экстренно поступающие пациенты с острым панкреатитом имеют как сопутствующие очаги инфекции, так и/или ассоциированные с поджелудочной железой. Нейтрофильные гранулоциты являются немедленно реагирующими эффекторами острого воспаления, а их реакция на асептическое или инфекционное воспаление может быть различной. Цель — определить функциональные характеристики нейтрофильных гранулоцитов как ранних маркеров инфекционного процесса при остром панкреатите. Проанализировано течение заболевания у 95 больных, поступивших в ГБУ СПб НИИ скорой помощи им. И.И. Джанелидзе с диагнозом «острый панкреатит» в 2022–2024 гг., возраст 20–80 лет. Тяжесть острого панкреатита определяли по шкале экспресс-оценки СПб НИИ скорой помощи им. И.И. Джанелидзе, выделяя легкую, среднюю и тяжелую степени. Венозную кровь исследовали в 1-е, 3-и и 10-е сутки госпитализации. Оценивали количество гранулоцитов и индекс реактивности гранулоцитов (Neut-RI) методом проточной цитометрии, абсолютное количество CD14⁺ гранулоцитов, содержание в сыворотке растворимых рецепторов CD14 (sCD14) и антимикробного пептида гранулоцитов — растворимого дефенсина NHP1. Дополнительно анализировали содержание в крови маркера системного воспаления IL-6 и маркера бактериальной инфекции — прокальцитонина. Статистический анализ проведен с помощью программы StatTech v. 4.6.1. Локальные или системные инфекции наблюдали у 57% больных с острым панкреатитом (от 28% при отечной форме до 83% при тяжелой форме). В 1-е и 3-и сутки госпитализации наибольшая значимость для выявления бактериальной инфекции установлена для Neut-RI (на 1-е и 3-и сутки соответственно, $p < 0,001$ и $p < 0,001$), sCD14 ($p = 0,004$ и $p = 0,044$) и дефенсина NHP1 ($p = 0,014$ и $p = 0,007$). Тяжесть

Адрес для переписки:

Арискина Ольга Борисовна
ГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский
институт скорой помощи имени И.И. Джанелидзе»
192242, Россия, Санкт-Петербург,
ул. Будапештская, 3.
Тел.: 8 (812) 384-46-68.
Факс: 8 (812) 384-46-46.
E-mail: olga.ariskina@mail.ru

Address for correspondence:

Olga B. Ariskina
St. Petersburg I. Dzhanelidze Research Institute
of Emergency Medicine
3 Budapeshitskaya St
St. Petersburg
192242 Russian Federation
Phone: +7 (812) 384-46-68.
Fax: +7 (812) 384-46-46.
E-mail: olga.ariskina@mail.ru

Образец цитирования:

Л.П. Пивоварова, О.Б. Арискина, И.В. Осипова,
А.Е. Демко, А.А. Рысева, М.И. Громов, В.М. Малькова,
Е.В. Маркелова «Функциональная активность
нейтрофильных гранулоцитов как ранний маркер
инфекционного воспаления при остром панкреатите»
// Российский иммунологический журнал, 2025. Т. 28,
№ 3. С. 651–658.
doi: 10.46235/1028-7221-17165-FAO

© Пивоварова Л.П. и соавт., 2025
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

L.P. Pivovarova, O.B. Ariskina, I.V. Osipova, A.E. Demko,
A.A. Ryseva, M.I. Gromov, V.M. Malkova, E.V. Markelova
“Functional activity of neutrophilic granulocytes as an early
marker of infectious inflammation in acute pancreatitis”,
Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii
Zhurnal, 2025, Vol. 28, no. 3, pp. 651–658.
doi: 10.46235/1028-7221-17165-FAO

© Pivovarova L.P. et al., 2025
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.46235/1028-7221-17165-FAO

острого панкреатита связана с наличием очаговой и/или системной бактериальной инфекции. Показатели, отражающие воспалительную активность нейтрофильных гранулоцитов — реактивность гранулоцитов (Neut-RI), уровни растворимых дефенсина NHP1 и CD14 — позволяют в первые часы от момента поступления пациента в стационар определить наличие и/или риск развития локальной или системной бактериальной инфекции. Показатель реактивности нейтрофильных гранулоцитов (Neut-RI) является доступным экспресс-тестом для выявления инфекционного компонента воспаления при остром панкреатите.

Ключевые слова: острый панкреатит, воспаление, инфекция, нейтрофильные гранулоциты

FUNCTIONAL ACTIVITY OF NEUTROPHILIC GRANULOCYTES AS AN EARLY MARKER OF INFECTIOUS INFLAMMATION IN ACUTE PANCREATITIS

Pivovarova L.P., Ariskina O.B., Osipova I.V., Demko A.E., Ryseva A.A., Gromov M.I., Malkova V.M., Markelova E.V.

St. Petersburg I. Dzhanlidze Research Institute of Emergency Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. Acute pancreatitis represents an initially aseptic inflammation of the pancreas gland. Emergency patients with acute pancreatitis have both concomitant, and/or pancreas-associated foci of infection. Granulocytes are considered immediately responding effector cells in acute inflammation, and their response to aseptic or infectious inflammation may be different. The purpose of our study was to determine some functional characteristics of granulocytes as early markers of the infectious process in acute pancreatitis. The course of the disease was followed in 95 patients (20 to 80 years old) admitted to the I. Dzhanlidze Research Institute of Emergency Care with a diagnosis of acute pancreatitis in 2022-2024. The severity of acute pancreatitis was determined according to the urgent assessment scale at the I. Dzhanlidze Research Institute of Emergency Care, distinguishing between mild, moderate and severe grades of the disease. Venous blood samples were examined on days 1, 3 and 10 of hospitalization. Granulocyte counts and the granulocyte reactivity index (Neut-RI) were estimated by means of flow cytometry. We have also determined absolute numbers of CD14⁺ granulocytes, contents of soluble CD14 receptors (sCD14) in blood serum, and concentrations of soluble defensin NHP1, an antimicrobial granulocyte peptide. Moreover, the contents of systemic inflammation markers (IL-6 and procalcitonin) were assayed in blood. Statistical analysis was performed using the StatTech v. 4.6.1 program. Local or systemic infections were observed in 57% of patients with acute pancreatitis (from 28% in the edematous form to 83% in the severe cases). On days 1 and 3 of hospitalization, the highest significance for detection of bacterial infection was established for Neut-RI (on days 1 and 3, respectively, $p < 0.001$ and $p < 0.001$), sCD14 ($p = 0.004$ and $p = 0.044$), and NHP1 defensin ($p = 0.014$ and $p = 0.007$). The severity of acute pancreatitis is associated with presence of focal and/or systemic bacterial infection. Indexes reflecting inflammatory activity of neutrophilic granulocytes, i.e., granulocyte reactivity (Neut-RI), levels of soluble NHP1 defensin and CD14, allow to determine the presence and/or risk of local or systemic bacterial infection in patients within several hours after their admission to hospital. Granulocyte reactivity index (Neut-RI) is a feasible rapid test for detection of infectious inflammation in acute pancreatitis.

Keywords: acute pancreatitis, inflammation, infection, neutrophil granulocytes

Введение

Принято считать, что острый панкреатит (ОП) — это первоначально асептическое воспаление поджелудочной железы. Однако экстренно поступающие пациенты с ОП могут иметь как сопутствующие очаги инфекции, так и ассоцииро-

ванные с поджелудочной железой. Известно, что преобладающими и немедленно реагирующими эффекторами острого воспаления являются нейтрофильные гранулоциты (НГ) [2, 4]. Можно предположить, что реакция гранулоцитов на асептическое или инфекционное воспаление

может быть отличной. Нейтрофильные гранулоциты обладают рядом свойств, обуславливающих их участие в патогенезе острого воспаления: богатый набор цитотоксических факторов; высокая чувствительность к всевозможным локальным изменениям гомеостаза; способность накапливаться в очагах поражения и инициировать цепную реакцию с выделением цитотоксических веществ, секретировать биологически активные вещества, активирующие предшественников медиаторов воспаления. Гранулоциты участвуют в реализации иммунокомплексных повреждений тканей и в антителозависимых цитотоксических реакциях [3]. В связи с этим оценка различных характеристик функций нейтрофильных гранулоцитов позволит определить ранние биомаркеры бактериальной инфекции и осуществлять скрининг наличия воспаления, ассоциированного с инфекцией.

Цель исследования состояла в определении функциональных характеристик нейтрофильных гранулоцитов как ранних биомаркеров инфекционного процесса при остром панкреатите.

Материалы и методы

Проведено обследование и анализ течения заболевания у 95 пациентов, последовательно поступивших в городскую панкреатологический центр ГБУ СПб НИИ скорой помощи им. И.И. Джанелидзе с диагнозом «острый панкреатит» с декабря 2022 года по март 2024 года. Критерии включения: возраст 20–80 лет, время от первых симптомов заболевания до поступления в стационар не более 48 часов; критерии исключения — наличие гепатитов В и С, ВИЧ, наркозависимости, онкологических и аутоиммунных заболеваний. Тяжесть ОП определяли по шкале первичной экспресс-оценки тяжести острого панкреатита СПб НИИ скорой помощи им. И.И. Джанелидзе [1] с выделением легкой, средней и тяжелой степени. Венозную кровь исследовали в 1-е, 3-е и 10-е сутки от момента госпитализации. Оценивали количество гранулоцитов и индекс реактивности гранулоцитов (Neut-RI, IF) методом проточной цитометрии (Sysmex XN1000), являющийся компонентом общего клинического анализа крови, относительное и абсолютное количество CD14⁺ нейтрофильных гранулоцитов (CD14⁺НГ) (иммуноцитохимический метод, МКА Dako, система визуализации Novocastra), содержание в сыворотке крови растворимых рецепторов CD14 (sCD14) (иммуоферментный метод (ИФА), Elabscience) и растворимого антимикробного пептида гранулоцитов — растворимого α -дефенсина (HNP 1-3, sDef) (ИФА, Elabscience). Дополнительно анализировали содержание в крови биомаркеров си-

стемного воспаления и бактериальной инфекции интерлейкина-6 (IL-6) (иммунохемилюминесцентный метод, ECL 8000, Lifotronic) и прокальцитонина (иммунохемилюминесцентный метод, Architect i2000, Abbot).

Наличие или отсутствие бактериальных локальных и/или системных процессов или осложнений ОП, других осложнений определяли в ходе клинического наблюдения и анализа данных истории болезни. Наличие инфекции, ассоциированной с поджелудочной железой, определяли при анализе данных бактериологического исследования и ДНК-диагностики внутриклеточных инфекционных агентов (CFX96, AmpliSens); наличие бактериемии — по результатам посева крови, наличие очагов инфекции иной локализации — по результатам лучевой диагностики, исследований мочи, бронхиального секрета, мокроты и др.

Статистический анализ проведен с помощью программы StatTech v. 4.6.1 (ООО «Статтех», Россия). Количественные показатели оценивали на предмет соответствия нормальному распределению (критерии Шапиро—Уилка и Колмогорова—Смирнова), описывали с помощью медианы (Me) и нижнего и верхнего квартилей ($Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$). Сравнение по количественному показателю выполняли с помощью U-критерия Манна—Уитни, направление и тесноту корреляционной связи между показателями оценивали с помощью коэффициента ранговой корреляции Спирмена. Прогностическая модель, характеризующая зависимость количественной переменной от факторов, разрабатывалась с помощью метода линейной регрессии. Для оценки диагностической значимости количественных признаков применяли метод анализа ROC-кривых; разделяющее значение количественного признака в точке cut-off определяли по наивысшему значению индекса Юдена. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Общая характеристика больных, частота инфекционных событий, тяжесть и исход заболевания представлены в таблице 1. Анализ частоты выявления очаговой или системной инфекции показал, что количество их ассоциировано с тяжестью острого панкреатита (умеренная теснота связи $r = 0,342$, $p = 0,007$).

Представленные в таблице сведения подтверждают, что лечение острого деструктивного панкреатита (ОДП) остается актуальной проблемой, прежде всего ОП тяжелой степени, которые сопровождаются высокой летальностью и

ТАБЛИЦА 1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА БОЛЬНЫХ С ОСТРЫМ ПАНКРЕАТИТОМ РАЗЛИЧНОЙ СТЕПЕНИ ТЯЖЕСТИ

TABLE 1. GENERAL CHARACTERISTICS OF PATIENTS WITH ACUTE PANCREATITIS OF VARYING SEVERITY

Группы больных Groups of patients	Количество Quantity	Возраст (годы) Age (years)	Индекс коморбидности (баллы) Comorbidity index (points)	Наличие очагов инфекции или сепсиса Presence of foci of infection or sepsis	Исход Issue	
					Выжили They survived	Умерли They died
	n	Me (Q _{0,25} -Q _{0,75})	Me (Q _{0,25} -Q _{0,75})	n, %	n, %	n, %
Легкой степени Mild degree	32	60 (43-71)	3 (2-5)	9 (28%)	32 (100%)	0
Среднетяжелый Medium-heavy	25	44 (39-66)	3 (2-4)	17 (68%)	25 (100%)	0
Тяжелый Heavy	39	41 (36-50)	4 (2-6)	33 (85%)	25 (64%)	14 (36%)
Всего Only	95	47 (36-51)	3 (2-5)	54 (57%)	81 (83%)	14 (17%)

Примечание. В группе больных с ОДП средней тяжести развился сепсис у 1 больного, в группе больных с тяжелым ОДП – у 17 (44%).

Note. In the group with moderate AP, sepsis developed in 1 patient, in the group with severe AP – in 17 patients (44%).

развиваются преимущественно у лиц молодого и среднего возраста [7, 8].

Результаты анализа функциональной активности нейтрофильных гранулоцитов представлены в таблице 2.

При сравнении количества НГ мы наблюдали статистически значимые различия между показателями у пациентов с отсутствием или наличием инфекции только на 10-е сутки после поступления в стационар ($p = 0,012$, U-критерий Манна–Уитни) (табл. 2). В этой точке количество НГ приобретало статистическую значимость как предиктор инфекционных осложнений ($AUC = 0,694$; 95% ДИ: 0,557-0,830, $p = 0,012$) с пороговым значением количества НГ в точке cut-off $8,2 \times 10^9$ /л. Наличие инфекции прогнозировалось при количестве гранулоцитов выше данной величины или равном ей. Чувствительность и специфичность прогностической модели составили 58,1% и 88,5% соответственно.

Анализ реактивности нейтрофильных гранулоцитов (Neut-RI), определяемой по уровню хемилюминесценции НГ, показал, что во все сроки наблюдения более высокие значения показателя выявили у больных с наличием очагов инфекции или сепсиса ($p < 0,001$, $p < 0,001$, $p = 0,003$ соответственно; U-критерий Манна–Уитни в двух случаях и t-критерий Стьюдента (табл. 2). Пороговое значение реактивности нейтрофилов в точке cut-off в 1-е сутки госпитализации составило 49,1 IF с чувствительностью 62,5% и специфичностью 67,6%.

CD14 представляет собой рецептор, закрепленный на гликозилфосфатидилинозитоле (GPI), ко-

торый служит корецептором для нескольких Toll-подобных рецепторов (TLR) как на поверхности клетки, так и в эндосомальном компартменте. CD14 может экспрессироваться клетками как гемопоэтического, так и негемопоэтического происхождения в виде рецептора клеточной мембраны или секретируемого белка [3, 9]. Большая часть доступной информации касается роли CD14 как корецептора, взаимодействующего с TLR4 и облегчающего клеточные реакции на низкие дозы липополисахарида (ЛПС). CD14 вместе с TLR4 и MD-2 образует мультирецепторный комплекс, который распознает липополисахариды на клеточной мембране. Важная защитная роль CD14 была установлена при некоторых формах кишечных инфекций, в то время как при легочных инфекциях были описаны как положительные, так и отрицательные эффекты в зависимости от возбудителя [9]. Возможно, исследование как мембранного рецептора CD14, так и растворимой его формы (sCD14) откроет новое в патогенезе острого панкреатита.

При оценке количества $CD14^+НГ \times 10^9$ /л в крови в зависимости от наличия или отсутствия инфекционных осложнений были выявлены существенные различия ($p = 0,002$) только на 10-е сутки от начала заболевания (U-критерий Манна–Уитни) (табл. 2). Полученная модель приобретала высокую статистическую значимость (площадь под ROC-кривой $0,745 \pm 0,068$ с 95% ДИ: 0,612-0,878; $p = 0,002$). Пороговое значение количества $CD14^+НГ$ в точке cut-off составило $2,49 \times 10^9$ /л для риска развития инфекции. Чувствительность и специфичность модели состави-

ТАБЛИЦА 2. ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С ОСТРЫМ ПАНКРЕАТИТОМ РАЗЛИЧНОЙ ТЯЖЕСТИ

TABLE 2. FUNCTIONAL ACTIVITY OF NEUTROPHIL GRANULOCYTES IN THE BLOOD OF PATIENTS WITH ACUTE PANCREATITIS OF VARYING SEVERITY

Показатели Indicators	Сроки наблюдения (дни) Observation period (days)	Категории Categories		p
		Отсутствие инфекции No infection	Наличие инфекции Presence of infection	
		Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$) M±SD (95% ДИ)	Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$) M±SD (95% ДИ)	
Количество НГ 2,7 (2,2-3,1) 10⁹/л Number of NG 2.7 (2.2-3.1) 10 ⁹ /L	1	11,2 (7,9-15,3) n = 42	11,4 (8,8-14,1) n = 48	0,821
	3	7,0 (4,0-11,0) n = 38	8,8 (5,0-11,5) n = 32	0,260
	10	5,1 (3,9-7,3) n = 26	9,6 (4,6-14,6) n = 31	0,012*
Реактивность НГ (Neut- RI) 44,8 (42,1-45,7) ИФ Granulocyte reactivity (Neut-RI) 44.8 (42.1-45.7) FI	1	47,90 (45,6-49,9) n = 37	51,25 (48,70-57,12) n = 40	< 0,001*
	3	47,6 (45,30-49,15) n = 35	55,75 (49,62-65,22) n = 44	< 0,001*
	10	47,13±2,67 (95% ДИ 46,1-48,2) n = 26	50,47±4,72 (95% ДИ 48,6-52,3) n = 28	< 0,003*
CD14⁺НГ 1,2 (0,5-1,4) 10⁹/л CD14 ⁺ NG 1.2 (0.5-1.4) 10 ⁹ /L	1	3,33 (2,17-4,56) n = 37	3,61 (2,72-4,96) n = 33	0,356
	3	2,17 (1,23-3,00) n = 39	2,68 (1,78-5,04) n = 39	0,100
	10	1,33 (0,71-2,17) n = 28	3,22 (1,24-5,40) n = 26	0,002*
sCD14 1,14 (1,14-1,16) мкг/мл sCD14 1.14 (1.14-1.16) mcg/mL	1	2,9 (1,82-3,77) n = 29	3,82 (3,04-5,38) n = 27	0,004*
	3	3,58 (2,16-5,69) n = 31	4,74 (3,51-6,82) n = 35	0,044*
	10	3,49±2,29 (2,48-4,50) n = 22	4,5±2,35 (3,46-5,54) n = 22	0,157
sDef 5,4 (3,7-6,7) нг/мл sDef 5.4 (3.7-6.7) ng/mL	1	19,5 (7,4-36,2) n = 37	43,7 (19,4-102,2) n = 36	0,014*
	3	15,8 (7,3-31,4) n = 36	36,1 (22,1-71,4) n = 36	0,007*
	9-10	10,4 (5,0-33,4) n = 26	46,3 (16,6-111,3) n = 30	0,012*

Примечание. * – различия между показателями у больных с отсутствием или наличием инфекции в течение госпитализации значимы (p < 0,05). ИФ – интенсивность флюоресценции.

Note. *, the differences between the indicators in patients with absence or presence of infection during hospitalization are significant (p < 0.05). FI, fluorescence intensity

ли 65,4% и 85,7% соответственно. Также на 10-е сутки наблюдения количество CD14⁺НГ значимо коррелировало с исходом заболевания по критерию «выжил-умер» (p = 0,034, коэффициент Спирмена).

В ходе исследования содержания в сыворотке крови растворимого CD14 (sCD14) в 1-е

(p = 0,004) и 3-и (p = 0,044) сутки заболевания были выявлены статистически значимые различия показателя у больных с отсутствием или наличием бактериальной инфекции. Площадь под ROC-кривой составила 0,724±0,068 с 95% ДИ 0,590-0,858; полученная модель была статистически значимой (p = 0,004). Пороговое значение

sCD14 в точке cut-off составило 3,28 мкг/мл, чувствительность — 70,4% и специфичность — 69,0%.

Нейтрофильные гранулоциты при острых и хронических воспалительных процессах быстро мигрируют в очаги воспаления, в регионарные лимфатические узлы и селезенку, где они секретируют биологически активные вещества, обладающие антимикробными, противогрибковыми и противовирусными свойствами, а также способные модулировать функции В- и Т-лимфоцитов [6], реакции гомеостаза при патологических процессах [5]. К числу таких факторов, секретируемых гранулоцитами, относятся дефенсины. При анализе содержания в крови растворимого дефенсина человека были установлены статистически значимые различия концентраций пептида у пациентов с наличием или отсутствием бактериальной инфекции в 1-е, 3-и и 10-е сутки наблюдения ($p = 0,014$, $p = 0,007$, $p = 0,012$ соответственно). Пороговое значение показателя в точке cut-off для инфекции 28,4 нг/мл, чувствительность — 58,3%, специфич-

ность — 59,5%. Площадь под ROC-кривой составила $0,667 \pm 0,063$ с 95% ДИ: 0,542–0,791. Полученная модель была статистически значимой ($p = 0,014$).

Выводы

1. Тяжесть острого панкреатита связана с наличием очаговой и/или системной бактериальной инфекции.

2. Показатели, отражающие воспалительную активность нейтрофильных гранулоцитов — реактивность гранулоцитов (Neut-RI), уровни растворимых дефенсинов NHP1 и CD14 — позволяют в первые часы от момента поступления пациента в стационар определить наличие и/или риск развития локальной или системной бактериальной инфекции.

3. Показатель реактивности гранулоцитов (Neut-RI) является доступным экспресс-тестом для выявления инфекционного компонента воспаления при остром панкреатите.

Список литературы / References

1. Багненко С.Ф., Толстой А.Д., Краснорогов В.Б., Курыгин А.А., Гринев М.В., Лапшин В.Н., Гольцов В.Р. Острый панкреатит (Протоколы диагностики и лечения) // *Анналы хирургической гепатологии*, 2006. Т. 11, № 1. С. 60–66. [Bagnenko S.F., Tolstoy A.D., Krasnorogov V.B., Kurygin A.A., Grinev M.V., Lapshin V.N., Goltsov V.R. Acute pancreatitis (Diagnostic and treatment protocols). *Annaly khirurgicheskoy gepatologii = Annals of Surgical Hepatology*, 2006, Vol. 11, no. 1, pp. 60–66. (In Russ.)]
2. Савченко А.А., Кудлай Д.А., Кудрявцев И.В., Каспаров Э.В., Головкин А.С., Продеус А.П., Борисов А.Г. Технологии диагностики и коррекции иммунометаболических нарушений. Клиническая иммунология для практических врачей. Красноярск: АС-КИТ, 2023. 454 с. [Savchenko A.A., Kudlai D.A., Kudryavtsev I.V., Kasparov E.V., Golovkin A.S., Prodeus A.P., Borisov A.G. Technologies for diagnostics and correction of immunometabolic disorders. Clinical immunology for practicing physicians]. Krasnoyarsk: AS-KIT, 2023. 454 p.
3. Савченко А.А., Борисов А.Г., Здзитовецкий Д.Э., Кудрявцев И.В., Медведев А.Ю., Мошев А.В., Гвоздев И.И. Фенотипический состав и функциональная активность моноцитов у больных острым панкреатитом // *Медицинская иммунология*, 2017. Т. 19, № 1. С. 45–54. [Savchenko A.A., Borisov A.G., Zdzitovetsky D.E., Kudryavtsev I.V., Medvedev A.Yu., Moshev A.V., Gvozdev I.I. Phenotypic composition and functional activity of monocytes in patients with acute pancreatitis. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2017. Vol. 19, no. 1, pp. 45–54. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2017-1-45-54.
4. Муратова Т.А., Аль-Кубайси Ш.С., Ларькова Е.С., Сайгина О.А., Леонтьев А.А., Калабкин Е.А., Летин А.В., Морозов В.В. Активности нейтрофильных гранулоцитов при остром панкреатите различной тяжести / *Современные проблемы науки и образования*. 2019. № 6. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://science-education.ru/article/view?id=29418>. [Muratova T.A., Al-Kubaysi Sh.S., Larkova E.S., Saygina O.A., Leontyev A.A., Kalabkin E.A., Letin A.V., Morozov V.V. Activities of neutrophilic granulocytes in acute pancreatitis of varying severity. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya = Modern Problems of Science and Education*, 2019, no. 6. [Electronic resource]. Available at: <https://science-education.ru/article/view?id=29418>. (In Russ.)]
5. Потапнев М.П., Гущина Л.М., Мороз Л.А. Фенотипическая и функциональная гетерогенность субпопуляций нейтрофилов в норме и при патологии // *Иммунология*, 2019. Т. 40, № 5. С. 84–96. [Potapnev M.P., Gushchina L.M., Moroz L.A. Phenotypic and functional heterogeneity of neutrophil subpopulations in norm and pathology. *Immunologiya = Immunology*, 2019, Vol. 40, no. 5, pp. 84–96. (In Russ.)]
6. Costa S., Bevilacqua D., Cassatella M.A., Scapini P. Recent advances on the crosstalk between neutrophils and B or T lymphocytes. *Immunology*, Vol. 156, no. 1, pp. 23–32.
7. Malheiro F., Ângelo-Dias M., Lopes T., Martins C.G., Borrego L.M. Cytokine dynamics in acute pancreatitis: the quest for biomarkers from acute disease to disease resolution. *J. Clin. Med.* 2024, Vol. 13, no. 8, 2287. doi: 10.3390/jcm13082287.

8. Nieminen A., Maksimow M., Mentula P., Kyhälä L., Kylänpää L., Puolakkainen P., Kemppainen E., Repo H., Salmi M. Circulating cytokines in predicting development of severe acute pancreatitis. *Crit. Care*, 2014, Vol. 18, no. 3, R104. doi: 10.1186/cc13885.
9. Zanoni I., Granucci F. The role of CD14 in protecting the body from infections and in regulating metabolism. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 2013, Vol. 3, 32. doi: 10.3389/fcimb.2013.00032.

Авторы:

Пивоварова Л.П. — д.м.н., руководитель отдела лабораторной диагностики ГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт скорой помощи имени И.И. Джанелидзе», Санкт-Петербург, Россия

Арискина О.Б. — к.б.н., научный сотрудник отдела лабораторной диагностики ГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт скорой помощи имени И.И. Джанелидзе», Санкт-Петербург, Россия

Осипова И.В. — к.м.н., старший научный сотрудник отдела лабораторной диагностики ГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт скорой помощи имени И.И. Джанелидзе», Санкт-Петербург, Россия

Демко А.Е. — д.м.н., профессор, заместитель директора по научной работе, руководитель отдела гепатохирургии ГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт скорой помощи имени И.И. Джанелидзе», Санкт-Петербург, Россия

Authors:

Pivovarova L.P., PhD, MD (Medicine), Head, Laboratory Diagnostics Department, St. Petersburg I. Dzhanelidze Research Institute of Emergency Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Ariskina O.B., PhD (Biology), Researcher, Laboratory Diagnostics Department, St. Petersburg I. Dzhanelidze Research Institute of Emergency Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Osipova I.V., PhD (Medicine), Senior Researcher, Laboratory Diagnostics Department, St. Petersburg I. Dzhanelidze Research Institute of Emergency Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Demko A.E., PhD, MD (Medicine), Professor, Deputy Director for Research, Head, Department of Hepatosurgery, St. Petersburg I. Dzhanelidze Research Institute of Emergency Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Рысева А.А. — врач клинической лабораторной диагностики лаборатории иммунологии ГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт скорой помощи имени И.И. Джанелидзе», Санкт-Петербург, Россия

Громов М.И. — д.м.н., руководитель отдела эфферентной терапии ГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт скорой помощи имени И.И. Джанелидзе», Санкт-Петербург, Россия

Малькова В.М. — врач-хирург, младший научный сотрудник отдела гепатохирургии ГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт скорой помощи имени И.И. Джанелидзе», Санкт-Петербург, Россия

Маркелова Е.В. — врач клинической лабораторной диагностики клинико-диагностической лаборатории ГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт скорой помощи имени И.И. Джанелидзе», Санкт-Петербург, Россия

Ryseva A.A., Doctor of Clinical Laboratory Diagnostics, Laboratory of Immunology, St. Petersburg I. Dzhanelidze Research Institute of Emergency Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Gromov M.I., PhD, MD (Medicine), Head, Department of Efferent Therapy, St. Petersburg I. Dzhanelidze Research Institute of Emergency Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Malkova V.M., Surgeon, Junior Researcher, Department of Hepatosurgery, St. Petersburg I. Dzhanelidze Research Institute of Emergency Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Markelova E.V., Doctor of Clinical Laboratory Diagnostics, Clinical Diagnostic Laboratory, St. Petersburg I. Dzhanelidze Research Institute of Emergency Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Поступила 28.03.2025
Принята к печати 25.05.2025

Received 28.03.2025
Accepted 25.05.2025

ИЗМЕНЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ CD184 И CD195 НА РАЗЛИЧНЫХ СУБПОПУЛЯЦИЯХ МОНОЦИТОВ У БОЛЬНЫХ ОСТРЫМ ПАНКРЕАТИТОМ ПРИ КОМПЛЕКСНОМ ЛЕЧЕНИИ С ЦИТОФЛАВИНОМ

Савченко А.А.¹, Здзитовецкий Д.Э.², Анисимова Е.Н.¹, Борисов Р.Н.²,
Адилов М.М.², Борисов А.Г.¹

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

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

Резюме. Разработка новых методов лечения острого панкреатита (ОП) должна осуществляться с учетом воздействий на ключевые процессы иммунопатогенеза заболевания. Моноциты являются клетками, через которые при ОП реализуются механизмы врожденного иммунитета (прежде всего, провоспалительные) и индукция реакций адаптивного иммунитета (как провоспалительные, так и противовоспалительные). Цитофлавин начинает применяться при лечении ОП, доказано его иммунокорректирующее действие, но отсутствуют данные о его влиянии на функциональную активность моноцитов. Целью исследования явилось изучение особенностей влияния цитофлавина при комплексном лечении ОП на экспрессию CD184 и CD195 на различных субпопуляциях моноцитов. Обследовано 35 больных (средний возраст $48,7 \pm 5,8$ года) средней и тяжелой степени тяжести ОП по шкале первичной экспресс-оценки. Все больные с помощью простой рандомизации были разделены на две группы: получившие комплексную терапию без цитофлавина (18 пациентов) и с цитофлавином (17 пациентов). Забор крови у больных ОП осуществлялся дважды: до начала терапии и через 14 суток лечения. В качестве контроля обследовано 32 здоровых людей аналогичного возраста. Субпопуляционный состав моноцитов, в том числе экспрессирующих CD184 (CXCR4) и CD195 (CCR5), исследовали методом проточной цитометрии с использованием прямой иммунофлуоресценции цельной периферической крови. До начала лечения у больных ОП обнаружено увеличение количества CD14⁺CD16⁺ моноцитов, уровень которых нормализуется после лечения с цитофлавином. У больных ОП до начала лечения повышается количество CD14⁺CD16⁺CD184⁺ и CD14⁺CD16⁺CD184⁺ моноцитов, а также уровень экспрессии рецептора на данных субпопуляциях. Содержание моноцитов с

Адрес для переписки:

Анисимова Елена Николаевна
Научно-исследовательский институт
медицинских проблем Севера
660022, Россия, г. Красноярск,
ул. Партизана Железняка, 3г.
Тел.: 8 (913) 173-87-89.
E-mail: foi-543@mail.ru

Address for correspondence:

Elena N. Anisimova
Research Institute of Medical Problems of the North
3g Partizan Zhelezniak St
Krasnoyarsk
660022 Russian Federation
Phone: +7 (913) 173-87-89.
E-mail: foi-543@mail.ru

Образец цитирования:

А.А. Савченко, Д.Э. Здзитовецкий, Е.Н. Анисимова, Р.Н. Борисов, М.М. Адилов, А.Г. Борисов «Изменение экспрессии CD184 и CD195 на различных субпопуляциях моноцитов у больных острым панкреатитом при комплексном лечении с цитофлавином» // Российский иммунологический журнал, 2025. Т. 28, № 3. С. 659-666. doi: 10.46235/1028-7221-17147-CIC

© Савченко А.А. и соавт., 2025

Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

A.A. Savchenko, D.E. Zdzitovetskiy, E.N. Anisimova, R.N. Borisov, M.M. Adilov, A.G. Borisov “Changes in CD184 and CD195 expression on various monocyte subpopulations in patients with acute pancreatitis during complex treatment with cytoflavin”, Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2025, Vol. 28, no. 3, pp. 659-666. doi: 10.46235/1028-7221-17147-CIC

© Savchenko A.A. et al., 2025

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

DOI: 10.46235/1028-7221-17147-CIC

данными фенотипами не меняется после стандартного лечения, но значительно возрастает при лечении с цитофлавином (при снижении уровня экспрессии). У больных ОП до начала лечения увеличивается содержание всех субпопуляций моноцитов, экспрессирующих CD195. Только после лечения с цитофлавином уровень CD195⁺ «классических» и «переходных» моноцитов снижается, тогда как уровень экспрессии CD195 возрастает на мембранах «переходных» и «неклассических» моноцитов. Таким образом, воспалительная реакция у больных ОП до начала лечения характеризуется наличием компенсаторных процессов за счет повышения содержания моноцитов с противовоспалительной функцией. В острый период заболевания (до начала лечения) большее количество моноцитов экспрессирует CXCR4 и CCR5. Общепринятая терапия не приводит к изменению субпопуляционного состава моноцитов и количества клеток с экспрессией CXCR4 и CCR5. После комплексного лечения с цитофлавином субпопуляционный состав моноцитов нормализуется, а также наблюдается перераспределение мигрирующих моноцитов: снижается содержание провоспалительных клеток и повышается уровень клеток с противовоспалительной и антигенпрезентирующей активностью.

Ключевые слова: острый панкреатит, моноциты, субпопуляция, экспрессия рецепторов, миграция, хемокины

CHANGES IN CD184 AND CD195 EXPRESSION ON VARIOUS MONOCYTE SUBPOPULATIONS IN PATIENTS WITH ACUTE PANCREATITIS DURING COMPLEX TREATMENT WITH CYTOFLAVIN

Savchenko A.A.^a, Zdzitovetskiy D.E.^b, Anisimova E.N.^a, Borisov R.N.^b, Adilov M.M.^b, Borisov A.G.^a

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

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

Abstract. The development of therapies for acute pancreatitis (AP) should consider their immune effects. Monocytes play a key role in innate and adaptive immune responses in AP. Cytoflavin has immunocorrective effects but there are lacking data on its influence on monocyte function. Our aim was to investigate the effect of cytoflavin on CD184 and CD195 expression in monocyte subpopulations during AP treatment. 35 patients (mean age 48.7±5.8 years) with moderate and severe AP were divided into two groups: 18 received standard therapy, 17 received cytoflavin. Blood samples were taken before and after 14 days of treatment. Control group: 32 healthy age-matched individuals. Monocyte subsets were analyzed by flow cytometry. Before the start of treatment, patients with AP showed an increase in the number of CD14⁺CD16⁺ monocytes, the level of which normalized after treatment with cytoflavin. The number of CD14⁺⁺CD16⁺CD184⁺ and CD14⁺CD16⁺CD184⁺ monocytes increases in patients with AP before the start of treatment, as does the level of receptor expression on these subsets. The content of monocytes with these phenotypes did not change after standard treatment but increased significantly with cytoflavin treatment. The monocyte subpopulations expressing CD195 were increased in AP patients before treatment. After therapy with cytoflavin, the level of CD195⁺ “classical” and “transitional” monocytes decreased, while the level of CD195 expression increased among “transitional” and “non-classical” monocytes. The inflammatory reaction in patients with AP before the start of treatment is characterized by the presence of compensatory processes, due to increased content of monocytes with anti-inflammatory function. Increased numbers of monocytes express CXCR4 and CCR5 during the acute phase of the disease. Conventional therapy doesn't lead to changes in the subset composition of monocytes and the number of cells expressing CXCR4 and CCR5. After treatment with cytoflavin, the subpopulation profile of monocytes is normalized, a redistribution of migrating monocytes is observed: the content of proinflammatory cells decreases and the level of cells with anti-inflammatory and antigen-presenting activity increases.

Keywords: acute pancreatitis, monocytes, subset, receptor expression, migration, chemokines

Введение

Несмотря на определенный прогресс в лечении острого панкреатита (ОП), уровень летальности данного заболевания (прежде всего за счет развития панкреонекроза) остается высоким [3, 4]. Данная проблема решается, с одной стороны, за счет внедрения новых методов лечения, с другой стороны, за счет изучения иммунопатогенеза ОП, что, в конечном случае, позволяет выявить новые мишени для разработки эффективных методов терапии.

Стерильное воспаление поджелудочной железы (ПЖ) при ОП приводит к высвобождению из ацинарных клеток молекулярных паттернов, ассоциированных с повреждением (DAMP), которые через рецепторы распознавания образов (PRR) активируют клетки врожденного иммунитета, что, в конечном счете, приводит к развитию местного и системного воспаления [10]. Важную роль в притоке провоспалительных фагоцитирующих клеток в ПЖ играет индукция CCL2 и IL-6 [5, 11]. При этом CCL2 является ведущим хемокином, стимулирующим миграцию моноцитов в ткань ПЖ. Активированные под действием комплекса воспалительных факторов моноциты дифференцируются в макрофаги или дендритные клетки [2]. Данный механизм во многом определяет эффективность воспалительного процесса в ПЖ, а также характер течения и исход ОП. В связи с этим активность миграции моноцитов в ткань ПЖ имеет важное значение для реализации воспалительного процесса.

В настоящее время в комплексное лечение ОП осуществляется внедрение новых препаратов, которые также могут оказывать влияние и на клетки иммунной системы. Одним из таких препаратов является цитофлавин. В ряде работ установлено, что цитофлавин обладает иммунокорректирующим и антиоксидантным действием, влияет на систему гемостаза [1, 9]. В частности, было показано, что цитофлавин в комплексном лечении ОП способствовал снижению уровня гипоксии ткани, восстановлению оксидантного статуса и сокращению времени пребывания больных в стационаре [9]. Однако особенности влияния цитофлавина на моноциты до сих пор не изучены.

Целью исследования явилось изучение особенностей влияния цитофлавина при комплексном лечении ОП на экспрессию CD184 и CD195 на различных субпопуляциях моноцитов.

Материалы и методы

Под наблюдением находилось 35 больных (средний возраст $48,7 \pm 5,8$ года, 20 мужчин и 15 женщин) средней и тяжелой степени тяжести ОП

по шкале первичной экспресс-оценки, проходивших лечение в отделениях хирургии и реанимации и интенсивной терапии КБУЗ «КМКБСМП им. Н.С. Карповича» г. Красноярск. Диагноз «ОП» устанавливался на основании результатов клинического, лабораторного и инструментального обследования. Всем больным при поступлении назначалась комплексная консервативная терапия согласно Национальным клиническим рекомендациям «Острый панкреатит» в зависимости от исходной тяжести заболевания. Наряду со стандартизированной терапией ОП проводилась коррекция выявленных нарушений биоэнергетических процессов в клетках иммунной системы. Это достигалось включением в комплекс медикаментозной терапии препарата «Цитофлавин». Цитофлавин вводили внутривенно капельно в разведении на 200 мл 5%-ного раствора декстрозы или 0,9%-ного раствора натрия хлорида. Скорость введения 3–4 мл/мин. Препарат вводили 2 раза в день (через 12 часов) в течение 14 суток. Каких-либо побочных явлений и осложнений при применении препарата цитофлавин за время проведения исследования не зафиксировано. Соответственно, в зависимости от терапии все больные с помощью простой рандомизации были разделены на две группы: получившие комплексную терапию без цитофлавина (18 пациентов) и с цитофлавином (17 пациентов). Забор крови у больных ОП осуществлялся дважды: до начала терапии и через 14 суток лечения. В качестве контроля обследовано 32 здоровых человека (18 мужчин и 14 женщин) аналогичного возраста.

Забор крови осуществляли в вакутайнеры с К₃ЭДТА (Becton Dickinson, США). Исследование количества и фенотипа моноцитов проводили не позднее 2 часов после забора крови. Подготовку образцов крови и настройку проточного цитометра осуществляли в соответствии с рекомендациями производителей антител. Удаление эритроцитов из образцов проводили по безотмывочной технологии с использованием лизирующего раствора VersaLyse (Beckman Coulter, США), к 975 мкл которого ex tempore добавляли 25 мкл фиксирующего раствора IOtest 3 Fixative Solution (Beckman Coulter, США). Анализ образцов проводили на проточном цитофлуориметре Navios™ (Beckman Coulter, США) Центра коллективного пользования КНЦ СО РАН. В соответствии с целью исследования была сформирована следующая панель: CD195-PE/CD184-ECD/CD16-PC7/CD14-APC/CD45-AAF750. При цитометрическом анализе подсчитывали процент флуоресцирующих клеток и среднюю интенсивность флуоресценции (MFI – Mean Fluorescence Intensity), по которой оценивали уровни экспрессии поверхностных рецепторов. В каждой пробе анализировали не менее 50 000 моноцитов. Обработку

цитофлуориметрических данных проводили при помощи программ Navios Software v.1.2 и Kaluza™ v.2.2 (Beckman Coulter, США).

Все исследования выполнены с информированного согласия испытуемых и в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» с поправками 2008 г. и «Правилами клинической практики в Российской Федерации», утвержденными Приказом Минздрава России от 19.06.2003 г. № 266. Протокол исследования был одобрен локальным этическим комитетом ФГБНУ Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук», обособленное подразделение «НИИ медицинских проблем Севера» (Протокол № 9 от 20.09.2023).

Описание выборки осуществляли с помощью подсчета медианы и интерквартильного размаха — Me ($Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$). Достоверность различий между показателями независимых выборок оценивали по непараметрическому критерию Манна–Уитни (Mann–Whitney U test). Достоверность различий в динамике лечения определяли по критерию Вилкоксона (Wilcoxon matched pairs test). Статистический анализ осуществляли в пакете прикладных программ Statistica 8.0 (StatSoft Inc., 2007).

Результаты и обсуждение

Количество моноцитов в крови у больных ОП до и после лечения соответствовало контрольным значениям (табл. 1). В то же время выявлены особенности в субпопуляционном составе моноцитов крови при ОП. До начала лечения обнаружено увеличение количества $CD14^+CD16^+$ моноцитов. После лечения повышение этой фракции сохранилось в группе больных, не получавших цитофлавин, тогда как в группе пациентов после комплексного лечения с цитофлавином наблюдалась нормализация содержания моноцитов с фенотипом $CD14^+CD16^+$.

При исследовании содержания моноцитов, экспрессирующих $CD184$, обнаружено, что у больных ОП до начала лечения повышается количество $CD14^{++}CD16^-CD184^+$ и $CD14^+CD16^+CD184^+$ моноцитов относительно контрольного диапазона (табл. 1). После лечения без цитофлавина содержание данных субпопуляций моноцитов не изменилось относительно исходных значений. Однако у пациентов, в комплексном лечении которых присутствовал цитофлавин, выявлялось выраженное увеличение количества субпопуляций с экспрессией $CD184$ (относительно контрольных и исходных значений, а также показателей, выявленных у пациентов после лечения

без цитофлавина). Также у больных ОП до и после лечения выявлено повышенное количество (относительно контрольных значений) всех основных субпопуляций моноцитов, экспрессирующих рецептор $CD195$. Однако если после лечения без цитофлавина содержание субпопуляций моноцитов с экспрессией $CD195$ не меняется относительно исходных значений, то после комплексного лечения с цитофлавином уровни $CD14^{++}CD16^-CD195^+$ и $CD14^{++}CD16^+CD195^+$ моноцитов значительно снижаются относительно исходных значений, а также выявленных у пациентов после стандартного лечения. При этом содержание $CD14^+CD16^+CD195^+$ моноцитов после лечения с цитофлавином не меняется относительно исходных значений.

При исследовании уровней экспрессии исследуемых маркеров было установлено, что экспрессия $CD184$ была повышена у больных ОП до и после лечения, как на общей фракции моноцитов, так и на всех основных субпопуляциях (табл. 2). Однако если после стандартного лечения экспрессия данного рецептора на моноцитах не менялась относительно исходных значений, то после комплексного лечения с цитофлавином экспрессия маркера на общей фракции моноцитов снизилась относительно исходного уровня. На клетках с фенотипами $CD14^{++}CD16^-$ и $CD14^{++}CD16^+$ экспрессия $CD184$ уменьшилась как относительно исходных величин, так и значений, выявленных у пациентов после стандартного лечения. В то же время на мембране $CD14^+CD16^+$ моноцитов у больных после лечения с цитофлавином экспрессия $CD184$ не изменилась относительно исходных значений.

Повышение экспрессии рецептора $CD195$ на общей фракции моноцитов было установлено только у больных ОП после комплексного лечения с цитофлавином как относительно контрольных и исходных значений, так и уровня, выявленного у пациентов с ОП после стандартного лечения (табл. 2). Причем повышенный уровень экспрессии $CD195$ на общей фракции моноцитов реализуется за счет субпопуляций с фенотипами $CD14^{++}CD16^+$ и $CD14^+CD16^+$. Кроме того, у больных ОП до начала лечения было обнаружено повышение уровня экспрессии $CD195$ на $CD14^{++}CD16^-$ моноцитах, а после лечения снижение его до контрольных значений.

Установлено, что в острый период заболевания (до начала лечения ОП) в крови у больных повышается содержание «неклассических» ($CD14^+CD16^+$) моноцитов, которые характеризуются высоким уровнем тропности к эндотелию сосудов и миграционной активностью [2]. Причем повышенный уровень данной фракции сохраняется и после лечения без цитофлавина, тогда как их количество нормализуется после

ТАБЛИЦА 1. СУБПОПУЛЯЦИОННЫЙ СОСТАВ МОНОЦИТОВ С ЭКСПРЕССИЕЙ CD184 И CD195 У БОЛЬНЫХ ОСТРЫМ ПАНКРЕАТИТОМ ПРИ КОМПЛЕКСНОМ ЛЕЧЕНИИ С ЦИТОФЛАВИНОМ, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 1. SUBPOPULATION COMPOSITION OF MONOCYTES WITH EXPRESSION OF CD184 AND CD195 IN PATIENTS WITH ACUTE PANCREATITIS DURING COMPLEX TREATMENT WITH CYTOFLAVIN, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

Показатели Indicators	Контроль Control 1	Больные панкреатитом Patients with pancreatitis		
		До лечения Before treatment 2	После лечения без цитофлавина After treatment without cytoflavin 3	После лечения с цитофлавином After treatment with cytoflavin 4
Моноциты, % Monocytes, %	6,8 (5,4-10,0)	7,1 (4,8-12,9)	6,9 (4,3-10,2)	7,0 (5,7-9,0)
Моноциты, 10 ⁹ /л Monocytes, 10 ⁹ /L	0,36 (0,19-0,52)	0,40 (0,18-0,57)	0,41 (0,21-0,63)	0,39 (0,20-0,54)
CD14 ⁺⁺ CD16 ⁻	76,2 (52,3-88,5)	74,0 (66,4-81,5)	75,1 (67,1-83,0)	74,0 (63,8-82,1)
CD14 ⁺⁺ CD16 ⁺ , %	20,0 (4,4-35,1)	12,5 (6,9-18,0)	16,9 (7,3-18,4)	18,5 (9,7-24,3)
CD14 ⁺ CD16 ⁺ , %	4,0 (2,3-6,6)	9,4 (4,4-11,7) p ₁ =0,018	7,5 (5,1-10,5) p ₁ =0,048	6,0 (4,8-7,2)
CD14 ⁺⁺ CD16 ⁻	29,5 (21,5-44,6)	54,7 (34,8-66,3) p ₁ = 0,015	52,1 (30,1-58,3) p ₁ = 0,018	71,9 (62,0-79,4) p ₁ < 0,001 p ₂ = 0,039 p ₃ = 0,035
CD14 ⁺⁺ CD16 ⁺ CD184 ⁺ , %	6,2 (1,5-14,5)	12,2 (8,2-15,2)	10,9 (7,0-15,4)	8,1 (6,8-9,7)
CD14 ⁺ CD16 ⁺ CD184 ⁺ , %	0,20 (0,09-0,67)	2,5 (0,9-4,3) p ₁ < 0,001	1,9 (0,5-2,8) p ₁ = 0,005	6,5 (3,1-10,1) p ₁ < 0,001 p ₂ = 0,025 p ₃ = 0,007
CD14 ⁺⁺ CD16 ⁻	0,03 (0,01-0,35)	62,0 (2,2-77,0) p ₁ < 0,001	49,8 (5,8-69,3) p ₁ < 0,001	1,47 (0,42-2,64) p _{1,3} < 0,001 p ₂ = 0,008
CD14 ⁺⁺ CD16 ⁺ CD195 ⁺ , %	0,07 (0,03-1,06)	11,5 (6,0-16,1) p ₁ < 0,001	9,2 (4,5-12,0) p ₁ < 0,001	2,6 (0,43-4,90) p ₁ = 0,010 p _{2,3} < 0,001
CD14 ⁺ CD16 ⁺ CD195 ⁺ , %	0,01 (0,005-0,590)	2,3 (1,0-3,6) p ₁ < 0,001	2,5 (1,2-4,1) p ₁ < 0,001	2,8 (0,53-5,00) p ₁ < 0,001

Примечание. p₁ – статистически значимые различия с показателями контрольной группы; p₂ – -/- между показателями больных острым панкреатитом до и после лечения; p₃ – -/- между показателями больных после лечения без цитофлавина и с цитофлавином.

Note. p₁, statistically significant differences with the indicators of the control group; p₂, -/- between the indicators of patients with acute pancreatitis before and after treatment; p₃, -/- between the indicators of patients after treatment without cytoflavin and with cytoflavin.

комплексного лечения с цитофлавином, что, соответственно, характеризует более выраженное снижение интенсивности воспаления при данной тактике лечения.

Миграционная активность моноцитов при ОП была исследована по экспрессии двух хемокиновых рецепторов – CD184 (CXCR4) и CD195 (CCR5). У больных ОП до начала лечения повышается количество «классических» (CD14⁺⁺CD16⁻) и «промежуточных» (CD14⁺⁺CD16⁺) моноцитов,

экспрессирующих CXCR4. При этом уровень экспрессии (MFI) CD184 у больных повышен как на общей фракции моноцитов, так и на всех трех субпопуляциях. Изменений исследуемых показателей после лечения без цитофлавина не выявлено. После комплексного лечения с цитофлавином количество CXCR4⁺ «классических» и «промежуточных» моноцитов значительно возрастает как относительно показателей здоровых людей, так и исходных значений. Причем уро-

ТАБЛИЦА 2. УРОВНИ ЭКСПРЕССИИ (MFI) CD184 И CD195 НА МОНОЦИТАХ У БОЛЬНЫХ ОСТРЫМ ПАНКРЕАТИТОМ ПРИ КОМПЛЕКСНОМ ЛЕЧЕНИИ С ЦИТОФЛАВИНОМ, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

TABLE 2. THE EXPRESSION LEVELS (MFI) OF CD184 AND CD195 ON MONOCYTES IN PATIENTS WITH ACUTE PANCREATITIS DURING COMPLEX TREATMENT WITH CYTOFLAVIN, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

Показатели Indicators	Контроль Control 1	Больные панкреатитом Patients with pancreatitis		
		До лечения Before treatment 2	После лечения без цитофлавина After treatment without cytoflavin 3	После лечения с цитофлавином After treatment with cytoflavin 4
Экспрессия CD184 CD184 expression				
Моноциты Monocytes	1,44 (1,37-1,75)	4,45 (3,99-5,36) p ₁ < 0,001	4,89 (4,12-6,02) p ₁ < 0,001	3,03 (1,72-4,12) p ₁ = 0,015 p ₂ = 0,042
CD14 ⁺⁺ CD16 ⁻	1,42 (1,37-1,77)	4,59 (3,92-4,98) p ₁ < 0,001	3,88 (3,08-5,01) p ₁ < 0,001	2,84 (1,68-3,12) p ₁ = 0,038 p ₂ < 0,001 p ₃ = 0,002
CD14 ⁺⁺ CD16 ⁺	1,44 (1,39-1,59)	5,21 (4,16-7,09) p ₁ < 0,001	5,34 (4,64-6,99) p ₁ < 0,001	3,39 (3,26-4,01) p _{1,3} < 0,001 p ₂ = 0,014
CD14 ⁺ CD16 ⁺	1,39 (1,30-2,28)	4,66 (3,83-10,80) p ₁ < 0,001	4,93 (3,24-6,04) p ₁ < 0,001	6,53 (3,05-9,24) p ₁ < 0,001
Экспрессия CD195 CD195 expression				
Моноциты Monocytes	8,68 (2,28-11,5)	7,05 (6,39-9,77)	8,11 (6,28-11,00)	18,35 (11,3-25,4) p ₁ = 0,003 p ₂ < 0,001 p ₃ = 0,005
CD14 ⁺⁺ CD16 ⁻	2,45 (2,32-6,83)	5,86 (3,83-7,65) p ₁ = 0,046	4,93 (3,11-7,04)	3,94 (2,75-5,88)
CD14 ⁺⁺ CD16 ⁺	3,78 (2,16-9,23)	7,91 (6,52-11,00)	6,57 (4,82-9,88)	22,36 (15,07-34,55) p _{1,2,3} < 0,001
CD14 ⁺ CD16 ⁺	8,48 (5,97-12,60)	11,00 (6,86-25,90)	12,27 (7,15-18,38)	25,05 (19,50-29,86) p _{1,2} < 0,001 p ₃ = 0,023

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. As for Table 1.

вень экспрессии маркера на общих моноцитах, а также на «классических» и «промежуточных» снижается относительно исходных значений, но остается повышенным относительно показателей здоровых людей.

В крови у больных ОП значительное повышается содержание всех трех субпопуляций моноцитов, экспрессирующих CCR5. При этом уровень экспрессии данного рецептора возрастает только на фракции «классических» моноцитов. После лечения без цитофлавина повышенное количество субпопуляций с экспрессией CCR5 сохраняется, но нормализуется уровень экспрессии

данного рецептора на поверхности «классических» моноцитов. После комплексного лечения с цитофлавином содержание «классических» и «переходных» моноцитов с экспрессией CCR5 снижается относительно исходных значений, но оставаясь повышенными относительно показателей здоровых людей. Также после лечения с цитофлавином значительно повышаются уровни экспрессии CCR5 на поверхности «переходных» и «неклассических» моноцитов.

Необходимо отметить, что мигрирующие моноциты в зоне воспаления могут дифференцироваться в макрофаги и дендритные клетки. Причем

направленность дифференцировки зависит в том числе и от мигрирующей субпопуляции моноцитов. Показано, что «классические» моноциты в большей степени дифференцируются в макрофаги, тогда как «промежуточные» и «неклассические» — в дендритные клетки [6]. Кроме того, доказано, что если CXCR4, осуществляя миграционную активность клеток, также стимулирует их провоспалительную активность, то CCR5 усиливает и миграционную активность, и уровень антигенпрезентации (с запуском процессов адаптивного иммунитета) [7, 8]. Соответственно, при комплексном лечении с цитофлавином наблюдается перераспределение мигрирующих моноцитов с про- и противовоспалительными функциями за счет особенностей экспрессии CXCR4 и CCR5.

Выводы

Воспалительная реакция у больных ОП уже до начала лечения характеризуется наличием компенсаторных процессов за счет повышения содержания моноцитов с противовоспалительной функцией.

В острый период заболевания количество моноцитов, экспрессирующих CXCR4 и CCR5, увеличивается.

Общепринятая терапия не приводит к изменению субпопуляционного состава моноцитов и количества клеток с экспрессией CXCR4 и CCR5.

После комплексного лечения с использованием цитофлавина субпопуляционный состав моноцитов нормализуется, кроме того наблюдается перераспределение мигрирующих моноцитов со снижением провоспалительной функции и повышением противовоспалительной и антигенпрезентирующей активности.

Список литературы / References

1. Лемешевская О.И., Сопрун Л.А., Камаева Э.А., Лукашенко М.В., Гаврилова Н.Ю. Роль препарата Цитофлавин в коррекции дисавтономии у больных с постковидным синдромом // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова, 2024. Т. 124, № 11. С. 140-146. [Lemeshevskaya O.I., Soprun L.A., Kamaeva E.A., Lukashenko M.V., Gavrilova N.Yu. The role of drug Cytoflavin in the correction of dysautonomia in patients with post-COVID syndrome. *Zhurnal nevrologii i psikiatrii im. S.S. Korsakova = S. Korsakov Journal of Neurology and Psychiatry*, 2024, Vol. 124, no. 11, pp. 140-146. (In Russ.)]
2. Трулев А.С., Борисов А.Г., Кудрявцев И.В., Лазанович В.А., Савченко А.А. Роль моноцитов в иммунопатогенезе инфекционно-воспалительных заболеваний: от теории к практике // Медицинский академический журнал, 2024. Т. 24, №4. С. 9-32. [Trulioff A.S., Borisov A.G., Kudriavtsev I.V., Lazanovich V.A., Savchenko A.A. Role of monocytes in immunopathogenesis of infectious and inflammatory diseases: from theory to practice. *Meditsinskiy akademicheskiy zhurnal = Medical Academic Journal*, 2024, Vol. 24, no. 4, pp. 9-32. (In Russ.)]
3. Эктон В.Н., Ходорковский М.А., Куркин А.В. Патогенетические аспекты выбора медикаментозной терапии в лечении острого панкреатита // Вестник экспериментальной и клинической хирургии, 2024. Т. 17. № 3. С. 137-146. [Ektov V.N., Khodorkovsky M.A., Kurkin A.V. Pathogenetic aspects of the choice of drug therapy in the treatment of acute pancreatitis. *Vestnik eksperimental'noy i klinicheskoy khirurgii = Journal of Experimental and Clinical Surgery*, 2024, Vol. 17, no. 3, pp. 137-146. (In Russ.)]
4. Critelli B., Hassan A., Lahooti I., Noh L., Park J.S., Tong K., Lahooti A., Matzko N., Adams J.N., Liss L., Quion J., Restrepo D., Nikahd M., Culp S., Lacy-Hulbert A., Speake C., Buxbaum J., Bischof J., Yazici C., Evans-Phillips A., Terp S., Weissman A., Conwell D., Hart P., Ramsey M., Krishna S., Han S., Park E., Shah R., Akshintala V., Windsor J.A., Mull N.K., Papachristou G., Celi L.A., Lee P. A systematic review of machine learning-based prognostic models for acute pancreatitis: Towards improving methods and reporting quality. *PLoS Med.*, 2025, Vol. 22, no. 2, e1004432. doi: 10.1371/journal.pmed.1004432.
5. Liu S., Szatmary P., Lin J.W., Wang Q., Sutton R., Chen L., Liu T., Huang W., Xia Q. Circulating monocytes in acute pancreatitis. *Front. Immunol.*, 2022, Vol. 13, 1062849. doi: 10.3389/fimmu.2022.1062849.
6. Padgett L.E., Araujo D.J., Hedrick C.C., Olingy C.E. Functional crosstalk between T cells and monocytes in cancer and atherosclerosis. *J. Leukoc. Biol.*, 2020, Vol. 108, no. 1, pp. 297-308.
7. Rawat K., Tewari A., Li X., Mara A.B., King W.T., Gibbings S.L., Nnam C.F., Kolling F.W., Lambrecht B.N., Jakubczak C.V. CCL5-producing migratory dendritic cells guide CCR5⁺ monocytes into the draining lymph nodes. *J. Exp. Med.*, 2023, Vol. 220, no. 6, e20222129. doi: 10.1084/jem.20222129.
8. Sadri F., Rezaei Z., Fereidouni M. The significance of the SDF-1/CXCR4 signaling pathway in the normal development. *Mol. Biol. Rep.*, 2022, Vol. 49, no. 4, pp. 3307-3320.
9. Silina E.V., Romyantseva S.A., Stupin V.A., Parfenov V.A., Bolevich S.B. Early predictive blood markers of hemorrhagic stroke – influence of cytoflavin therapy. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 2021, Vol. 99, no. 1, pp. 72-79.

10. Xu Y., Song J., Gao J., Zhang H. Identification of biomarkers associated with oxidative stress and immune cells in acute pancreatitis. *J. Inflamm. Res.*, 2024, Vol. 25, no. 17, pp. 4077-4091.
11. Yao J., Zhang S., Zhou F., Zhuang M., Fei S. The relationship between inflammatory cytokines and in-hospital complications of acute pancreatitis. *Immun. Inflamm. Dis.*, 2024, Vol. 12, no. 2, e1203. doi: 10.1002/iid3.1203.

Авторы:

Савченко А.А. — д.м.н., профессор, заведующий лабораторией клеточно-молекулярной физиологии и патологии Научно-исследовательского института медицинских проблем Севера — обособленного подразделения ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр “Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук”», г. Красноярск, Россия

Здзитовецкий Д.Э. — д.м.н., профессор, заведующий кафедрой факультетской хирургии имени профессора Ю.М. Лубенского ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения РФ, г. Красноярск, Россия

Анисимова Е.Н. — к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории клеточно-молекулярной физиологии и патологии Научно-исследовательского института медицинских проблем Севера — обособленного подразделения ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр “Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук”», г. Красноярск, Россия

Борисов Р.Н. — к.м.н., доцент кафедры факультетской хирургии имени профессора Ю.М. Лубенского ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения РФ, г. Красноярск, Россия

Адилов М.М. — ассистент кафедры факультетской хирургии имени профессора Ю.М. Лубенского ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения РФ, г. Красноярск, Россия

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

Authors:

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

Zdritovetskiy D.E., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Yu. Lubensky Department of Faculty Surgery, V. Voino-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University, Krasnoyarsk, Russian Federation

Anisimova E.N., PhD (Medicine), Senior Researcher, Cellular-Molecular Physiology and Pathology Laboratory, Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk Research Center, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Krasnoyarsk, Russian Federation

Borisov R.N., PhD (Medicine), Associate Professor, Yu. Lubensky Department of Faculty Surgery, V. Voino-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University, Krasnoyarsk, Russian Federation

Adilov M.M., Assistant Professor, Yu. Lubensky Department of Faculty Surgery, V. Voino-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University, Krasnoyarsk, Russian Federation

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

Поступила 28.03.2025
Отправлена на доработку 15.04.2025
Принята к печати 25.05.2025

Received 28.03.2025
Revision received 15.04.2025
Accepted 25.05.2025

РЕГУЛЯЦИЯ СИНТЕТИЧЕСКИМ ПЕПТИДОМ ZP2 АНТИЦИТОКИНОВОЙ АКТИВНОСТИ МИКРООРГАНИЗМОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ПРИ ПОСЛЕОПЕРАЦИОННЫХ ОСЛОЖНЕНИЯХ

Пашина О.А., Пашкова Т.М., Гриценко В.А.

Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза Уральского отделения Российской академии наук —
обособленное структурное подразделение ФГБУН «Оренбургский федеральный исследовательский центр»
Уральского отделения Российской академии наук, г. Оренбург, Россия

Резюме. Синтетический аналог активного центра гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ) — пептид ZP2 обладает широким спектром иммунобиологических эффектов, в том числе антибактериальной активностью. Вместе с тем его влияние (в субингибиторных концентрациях) на биологические свойства грамотрицательных бактерий разных видов остается малоизученным. Целью настоящего исследования явилась сравнительная оценка влияния синтетического пептида ZP2 — аналога активного центра ГМ-КСФ на антицитокиновую активность грамотрицательных бактерий разных видов, выделенных при послеоперационных осложнениях. В работе использовано 42 клинических изолята грамотрицательных бактерий разных видов (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter braakii*, *C. freundii*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Pseudomonas aeruginosa*, *P. putida*), выделенных от пациентов с послеоперационными осложнениями. В эксперименте микроорганизмы выращивали в мясо-пептонном бульоне (МПБ) с синтетическим пептидом ZP2 при 37 °C в течение 24 часов. Антицитокиновую активность (АЦА) в отношении IL-4, IL-8, IL-1Ra и TNFα определяли методом иммуноферментного анализа (ИФА). Для оценки АЦА рассчитывали долю инактивации цитокинов в опыте относительно контроля и выражали в пг/мл. В экспериментах *in vitro* исследована способность клинических изолятов грамотрицательных бактерий, выделенных при послеоперационных осложнениях, инактивировать некоторые про- и противовоспалительные цитокины (IL-4, IL-8, IL-1Ra, TNFα) и показана ее зависимость от родовой/видовой принадлежности микроорганизмов. Выявлено, что синтетический пептид ZP2 характеризовался ингибирующим и индифферентным действием в отношении способности клинических штаммов микроорганизмов инактивировать изученные про- и противовоспалительные цитокины. Установлено, что ZP2 обладает модифицирующим потенциалом, который способен изменять как распространенность, так и выраженность АЦА клинических изолятов грамотрицательных бактерий, выделенных при послеоперационных осложнениях. Грамотрицательные бактерии, выделенные при послеоперационных

Адрес для переписки:

Пашина Ольга Александровна
Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза
Уральского отделения Российской академии наук
460000, Россия, г. Оренбург, ул. Пионерская, 11.
Тел.: 8 (922) 543-91-41.
E-mail: olga25miko@mail.ru

Address for correspondence:

Olga A. Pashinina
Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis
11 Pionerskaya St
Orenburg
460000 Russian Federation
Phone: +7 (922) 543-91-41.
E-mail: olga25miko@mail.ru

Образец цитирования:

О.А. Пашина, Т.М. Пашкова, В.А. Гриценко
«Регуляция синтетическим пептидом ZP2
антицитокиновой активности микроорганизмов,
выделенных при послеоперационных осложнениях»
// Российский иммунологический журнал, 2025. Т. 28,
№ 3. С. 667-672.
doi: 10.46235/1028-7221-17151-ROA
© Пашина О.А. и соавт., 2025
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

O.A. Pashinina, T.M. Pashkova, V.A. Gritsenko "Regulation
of anti-cytokine activity of bacterial isolates in post-surgical
complications by synthetic peptide ZP2", Russian Journal
of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2025,
Vol. 28, no. 3, pp. 667-672.
doi: 10.46235/1028-7221-17151-ROA
© Pashinina O.A. et al., 2025
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.46235/1028-7221-17151-ROA

осложнениях, способны секретировать соединения, инактивирующие цитокины IL-4, IL-8, IL-1Ra, TNF α . Синтетический пептид ZP2 в субингибиторных концентрациях оказывает модифицирующее действие на проявление изученными микроорганизмами АЦА. Выявленные в экспериментах *in vitro* модифицирующие эффекты синтетического пептида ZP2 расширяют спектр его потенциального клинического применения.

Ключевые слова: послеоперационные осложнения, грамотрицательные бактерии, антицитокиновая активность, регуляция, синтетический аналог активного центра ГМ-КСФ, пептид ZP2

REGULATION OF ANTI-CYTOKINE ACTIVITY OF BACTERIAL ISOLATES IN POST-SURGICAL COMPLICATIONS BY SYNTHETIC PEPTIDE ZP2

Pashinina O.A., Pashkova T.M., Gritsenko V.A.

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

Abstract. The ZP2 peptide is a synthetic analogue of active center in granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF). It exerts a wide range of immunobiological effects, including antibacterial activity. However, its effect (at sub-inhibitory concentrations) on the biology of Gram-negative bacteria remains poorly understood. The aim of this study was to compare the effect of the synthetic peptide ZP2 on the anti-cytokine activity (ACA) of Gram-negative bacteria isolated during infectious complications post-surgery. The study included 42 clinical isolates of Gram-negative bacteria of various species (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter braakii*, *C. freundii*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Pseudomonas aeruginosa*, *P. putida*) obtained from patients with post-surgical complications. The microorganisms were grown in meat-peptone broth (BCH) with synthetic peptide ZP2 at 37°C for 24 hours. ACA against IL-4, IL-8, IL-1Ra and TNF α was determined by enzyme immunoassay (ELISA). To evaluate ACA, the proportion of cytokine inactivation in the experiment relative to controls was calculated and expressed as pg/ml. The *in vitro* experiments were conducted to assess the ability to inactivate some pro- and anti-inflammatory cytokines (IL-4, IL-8, IL-1Ra, TNF α) by different bacterial isolates, thus demonstrating a genus/species dependence of these effects. It was shown that the synthetic ZP2 peptide was characterized by an inhibitory and indifferent effect on the ability of clinical strains of microorganisms to inactivate the studied pro- and anti-inflammatory cytokines. It has been established that ZP2 has a modifying potential that can change both incidence and grade of the ACA of Gram-negative bacteria isolates obtained at post-surgical complications. Gram-negative bacteria isolated during postoperative complications are capable of secreting compounds that inactivate cytokines IL-4, IL-8, IL-1Ra, TNF α . Synthetic peptide ZP2 at sub-inhibitory concentrations exerts a modifying effect on manifestations of anticytokine activity by the studied microorganisms. The revealed *in vitro* modifying effects of synthetic peptide ZP2 expand the range of its potential clinical applications.

Keywords: postsurgical complications, Gram-negative bacteria, anticytokine activity, regulation, GM-CSF analogue, ZP2 peptide

Введение

В настоящее время одними из наиболее перспективных препаратов являются синтетические пептиды, обладающие широкой биологической активностью. Такие препараты получают из человеческих активных молекул пептидной природы — например синтетический пептид активного центра гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ) — ZP2. Пептид ZP2 обладает иммуностимулирующим и репаративным действием, характери-

зуется антимикробным влиянием на музейные и клинические изоляты грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов [2, 3, 4]. Синтетический пептид ZP2, обладающий широким спектром иммунобиологических эффектов, является основой косметического средства «Ацеграм», которое используется для местного применения в терапевтической и хирургической практике [5].

Установлено, что чаще всего инфекционно-воспалительные процессы ассоциированы с микро-

организмами, обладающими набором факторов персистенции [6, 7]. Так, в настоящее время в научной литературе широко изучается способность микроорганизмов инактивировать про- и противовоспалительные цитокины. Показано, что антицитокиновая активность (АЦА) встречается у микроорганизмов, выделенных при различных инфекционно-воспалительных процессах [6, 7, 8].

Ранее было экспериментально установлено, что синтетический пептид ZP2 способен влиять на выраженность АЦА у клинических изолятов грамположительных и грамотрицательных бактерий разной видовой принадлежности [3, 10] и грибов рода *Candida* [9]. Однако факт влияния ZP2 на АЦА грамотрицательных микроорганизмов, выделенных от пациентов с послеоперационными осложнениями, требует более детального изучения.

Целью настоящего исследования явилась сравнительная оценка влияния синтетического пептида ZP2 — аналога активного центра ГМ-КСФ на АЦА грамотрицательных бактерий разных видов, выделенных при послеоперационных осложнениях.

Материалы и методы

В эксперименты *in vitro* были включены клинические изоляты грамотрицательных бактерий разных видов: *Escherichia coli* (n = 6), *Klebsiella pneumoniae* (n = 6), *Citrobacter braakii* (n = 6), *C. freundii* (n = 6), *Stenotrophomonas maltophilia* (n = 6), *Pseudomonas aeruginosa* (n = 6), *P. putida* (n = 6), выделенные при послеоперационных осложнениях у пациентов с хирургической патологией.

Выделение чистых культур микроорганизмов проводили общепринятым бактериологическим методом, видовую идентификацию осуществляли по прямому белковому профилированию с помощью масс-спектрометра MALDI TOF MS серии Microflex LT (Bruker Daltonics, Германия) и программного обеспечения MaldiBioType 3.0.

Для изучения влияния синтетического пептида ZP2 на АЦА клинических изолятов грамотрицательных бактерий проводили культивирование 1 мл взвеси бактерий в физиологическом растворе с 1 мл раствора пептида ZP2 с концентрацией 0,1 мкг/мл в 2 мл МПБ при 37 °С в течение 24 ч. В качестве контроля использовали пробы без добавления пептида ZP2. Затем контрольные и опытные пробы центрифугировали в течение 15 мин при 3000 об/мин, супернатант сливали, добавляли к осадку 2 мл МПБ и ресуспендировали.

АЦА в отношении IL-8, IL-4, TNF α и IL-1Ra определяли ИФА по известной методике в оригинальной модификации с использованием наборов ООО «Цитокин» (Санкт-Петербург) [1].

Для этого в центрифужные пробирки вносили в соотношении 1:1 взвесь бактерий и растворы соответствующих цитокинов, пробы инкубировали в течение 2 часов при 37 °С. После инкубации реакцию останавливали на холоде, центрифугировали при 3000 об/мин в течение 15 мин (+4 °С) и отбирали супернатанты. В качестве контроля использовали растворы цитокинов в физиологическом растворе. Конечная концентрация цитокинов в опытных и контрольных пробах составляла для IL-8 — 62,5 пг/мл, IL-4 — 28,6 пг/мл, TNF α — 41,6 пг/мл, IL-1Ra — 416,6 пг/мл.

Результаты учитывали на фотометре StatFax 2100 (США) при длине волны 450 нм. Для оценки АЦА клинических изолятов грамотрицательных бактерий, вычисляли долю инактивации цитокинов в опыте относительно контроля и выражали в пг/мл.

Полученные данные обработаны с помощью вариационной статистики.

Результаты и обсуждение

Полученные данные свидетельствовали, о том, что штаммы бактерий, выделенные при послеоперационных осложнениях, способны секретировать соединения, инактивирующие IL-8, IL-4, TNF α и IL-1Ra (рис. 1). При этом наблюдалась межвидовая вариабельность как по наличию и частоте встречаемости, так и по выраженности указанного признака.

Так, показано, что 33,3% изолятов *E. coli* и *C. braakii*; 50% штаммов *P. aeruginosa* и 66,7% штаммов *S. maltophilia* были способны инактивировать IL-8 со средним значением выраженности признака $53,3 \pm 2,8$ пг/мл. Минимальное значение АЦА было характерно для изолятов *P. aeruginosa* ($38,7 \pm 2,8$ пг/мл), а максимальное — для штаммов *E. coli* ($62,0 \pm 1,4$ пг/мл).

Под действием синтетического пептида ZP2 количество штаммов *E. coli* и *P. aeruginosa*, обладающих АЦА в отношении IL-8, не изменялось, а выраженность признака оставалась на прежнем уровне, что указывало на индифферентность данных бактерий к влиянию указанного пептида. Напротив, 66,7% штаммов *S. maltophilia*, проявляющие АЦА к IL-8, под влиянием синтетического пептида ZP2 теряли такую способность. Число штаммов *C. braakii*, характеризующихся наличием АЦА в отношении IL-8, под влиянием ZP2 увеличивалось вдвое — с 33,3% до 66,7%, хотя выраженность признака значимо не изменялась.

По 33,3% штаммов *E. coli* и *P. putida* и 66,7% изолятов *K. pneumonia* обладали АЦА к IL-1Ra, среднее значение признака составило $347,3 \pm 7,6$ пг/мл. Действие пептида ZP2 приводило к ингибированию АЦА в отношении IL-1Ra у всех штаммов клебсиелл и псевдомонад, но не

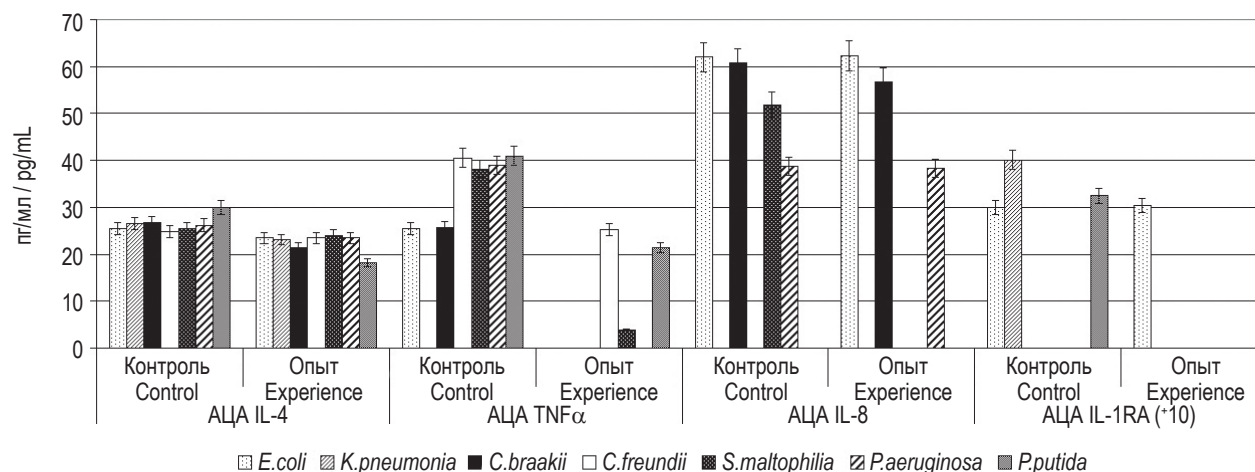


Рисунок 1. Влияние пептида ZP2 на антицитокиновую активность клинических изолятов

Примечание. * – $p < 0,01$.

Figure 1. The effect of peptide ZP2 on the anticytokine activity of clinical isolates

Note. *, $p < 0.01$.

изменяло распространенность и выраженность признака среди эшерихий.

Показано, что 33,3% штаммов *E. coli*, 66,7% изолятов *K. pneumoniae*, *S. maltophilia* и *C. freundii* и все штаммы *P. aeruginosa*, *P. putida* и *C. braakii* проявляли АЦА в отношении IL-4. Среднее значение признака составило $26,5 \pm 2,2$ пг/мл, при этом разброс значений был не значительным — минимум был характерен для штаммов *C. freundii* ($24,8 \pm 2,5$ пг/мл), максимум — для изолятов *P. putida* ($30,0 \pm 2,4$ пг/мл). После влияния ZP2 количество штаммов *P. aeruginosa*, *P. putida*, *C. braakii* и *C. freundii*, способных инактивировать IL-4 не изменилось, а количество изолятов *E. coli*, *K. pneumoniae* и *S. maltophilia* с данной активностью увеличилось до 100%. При этом достоверных изменений выраженности АЦА в отношении IL-4 не было выявлено, за исключением штаммов *P. putida*, выраженность признака у которых снизилась в 1,6 ($p < 0,01$).

Треть штаммов *P. putida*, *C. braakii*, *C. freundii* и *S. maltophilia*; 66,7% изолятов *E. coli* и 100% *P. aeruginosa* обладали АЦА в отношении TNFα. Среднее значение признака составило $34,9 \pm 3,4$ пг/мл. Минимальное значение АЦА в отношении TNFα отмечалось у штаммов *E. coli* ($25,4 \pm 3,4$ пг/мл), максимальное — у изолятов *P. putida* ($40,9 \pm 3,4$ пг/мл). В результате действия пептида ZP2 число штаммов *E. coli*, *P. aeruginosa* и *C. braakii* с данной способностью снижалось до 0. С другой стороны, пептид ZP2 увеличивал количество изолятов *S. maltophilia* и *P. putida*, способных инактивировать TNFα до 66,7% и 100% соответственно, причем выраженность этого признака достоверно уменьшалась (в 9,8 и 1,9 раза, $p < 0,01$). Среди штаммов *C. freundii* под

влиянием пептида ZP2 число изолятов с АЦА в отношении TNFα не изменялось, тогда как выраженность данного признака снижалась в 1,6 раза ($p < 0,01$).

Таким образом, синтетический пептид ZP2 в зависимости от рода/вида грамотрицательных бактерий по-разному влиял на проявление ими АЦА к изученным цитокинам (IL-8, IL-1Ra, IL-4, TNFα), что указывало на его родо- и видоспецифические эффекты в отношении способности микроорганизмов инактивировать указанные цитокины.

В результате проведенных исследований установлено, что все большинство клинических изолятов грамотрицательных бактерий разной видовой принадлежности (66,7–100%) за исключением штаммов *E. coli* (доля которых составила 33,3%) были способны инактивировать противовоспалительный цитокин IL-4, тогда как в отношении IL-1Ra АЦА обнаруживалась среди энтеробактерий только у штаммов *E. coli* и *K. pneumoniae*, а из группы неферментирующих бактерий — у *P. putida*.

Что касается провоспалительных цитокинов, то к инактивации TNFα были способны все изученные микроорганизмы, кроме изолятов *K. pneumoniae*, в отличие от АЦА в отношении IL-1Ra, которой обладали только штаммы *E. coli*, *K. pneumoniae* и *P. putida*.

Таким образом, в настоящем исследовании дана сравнительная оценка способности клинических изолятов грамотрицательных бактерий, выделенных при послеоперационных осложнениях, инактивировать некоторые про- и противовоспалительные цитокины и показана ее за-

висимость от родовой/видовой принадлежности микроорганизмов.

В то же время результаты экспериментов *in vitro* указывали на то, что синтетический пептид ZP2 проявлял преимущественно ингибирующее действие на частоту встречаемости и выраженность у изученных клинических изолятов грамотрицательных бактерий АЦА в отношении про- и противовоспалительных цитокинов (IL-4, IL-8, IL-1Ra, TNF α). При этом выраженность АЦА в отношении IL-8 не изменялась (*E. coli*, *P. aeruginosa* и *C. braakii*) или критично уменьшалась (*S. maltophilia*); АЦА в отношении IL-1Ra не изменялась (*E. coli*) и исчезала (*K. pneumoniae* и *P. putida*); выраженность АЦА в отношении IL-4 у всех изученных микроорганизмов существенно не изменялась.

Эти данные отражают модифицирующий потенциал синтетического пептида ZP2, который способен изменять как распространенность, так и выраженность изученного признака.

Ранее аналогичные эффекты были зарегистрированы на примерах изучения влияния синтетического пептида ZP2 на АЦА различных микроорганизмов: бактерий рода *Enterococcus*, выделенных из секрета предстательной железы мужчин с признаками урогенитальной инфекции [10]; грибов рода *Candida*, выделенных из

отделяемого влагалища условно-здоровых беременных [9].

В совокупности эти данные свидетельствуют о возможности изменения концентрации про- и противовоспалительных цитокинов в среде культивирования микроорганизмов при действии на них синтетического пептида ZP2, что не исключает подобного действия данного пептида в условиях *in vivo*.

Таким образом, выявленные в экспериментах *in vitro* модифицирующие эффекты синтетического пептида ZP2, входящего в состав косметического средства Ацеграм, в отношении способности клинических изолятов инактивировать отдельные про- и противовоспалительные цитокины расширяют спектр потенциального клинического применения указанного препарата.

Выводы

1. Грамотрицательные бактерии, выделенные при послеоперационных осложнениях, способны секретировать соединения, инактивирующие цитокины IL-4, IL-8, IL-1Ra, TNF α .

2. Синтетический пептид ZP2 в субингибиторных концентрациях оказывает модифицирующее действие на проявление изученными микроорганизмами АЦА.

Список литературы / References

1. Бухарин О.В., Перунова Н.Б., Чайникова И.Н., Иванова Е.В., Смолягин А.И. Антицитокиновая активность микроорганизмов // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии, 2011. № 4. С. 56-61. [Buharin O.V., Perunova N.B., Chajnikova I.N., Ivanova E.V., Smolyagin A.I. Anti-cytokine activity of microorganisms. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunologii* = *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2011, no. 4, pp. 56-61. (In Russ.)]
2. Гриценко В.А., Тяпаева Я.В., Добрынина М.А., Зурочка А.В. Сравнительный анализ бактерицидных свойств синтетического пептида активного центра ГМ-КСФ – ZP2 в отношении грамотрицательных бактерий разной таксономической принадлежности // Российский иммунологический журнал, 2021. Т.24, № 2. С. 221-228. [Gritsenko V.A., Tyapayeva Ya.V., Dobrynina M.A., Zurochka A.V. Comparative analysis of bactericidal properties of the synthetic peptide of the active center of GM-CSF – ZP2 in relation to gram-negative bacteria of different taxonomic affiliation. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal* = *Russian Journal of Immunology*, 2021, Vol. 24, no. 2, pp. 221-228. (In Russ.)] doi: 10.46235/1028-7221-1016-CAO.
3. Зурочка А.В., Добрынина М.А., Зурочка В.А., Гриценко В.А. Чувствительность музейных и клинических штаммов энтеробактерий к синтетическому пептиду активного центра ГМ-КСФ – ZP2 // Российский иммунологический журнал, 2020. Т. 23, № 4. С. 403-410. [Zurochka A.V., Dobrynina M.A., Zurochka V.A., Gritsenko V.A. Sensitivity of museum and clinical strains of enterobacteria to the synthetic peptide of the active center of GM-CSF – ZP2. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal* = *Russian Journal of Immunology*, 2020, Vol. 23, no. 4, pp. 403-410. (In Russ.)] doi: 10.46235/1028-7221-503-SOA.
4. Зурочка А.В., Зурочка В.А., Добрынина М.А., Гриценко В.А. Иммунобиологические свойства гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора и синтетических пептидов его активного центра // Медицинская иммунология, 2021. Т.23, № 5. С. 1031-1054. [Zurochka A.V., Zurochka V.A., Dobrynina M.A., Gritsenko V.A. Immunobiological properties of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and synthetic peptides of its active center. *Meditinskaya immunologiya* = *Medical Immunology (Russia)*, 2021, Vol. 23, no. 5, pp. 1031-1054. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-IPO-2216.
5. Зурочка А.В., Гриценко В.А., Зурочка В.А., Добрынина М.А., Черешнев В.А. Гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (ГМ-КСФ) и его синтетические аналоги: иммунобиологические эффекты и клиническое применение. Екатеринбург: УрО РАН, 2021. 288 с. [Zurochka A.V., Gritsenko V.A., Zurochka V.A., Dobrynina M.A., Chereshevnev V.A. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)

and its synthetic analogues: immunobiological effects and clinical application]. Ekaterinburg: Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, 2021. 288 p.

6. Карташова О.Л., Пашкова Т.М., Пашина О.А., Морозова Н.В. Антицитокиновая активность и способность к продукции цитокиноподобных веществ стафилококков, выделенных из секрета предстательной железы у мужчин с симптомами урогенитальной инфекции // Российский иммунологический журнал, 2021. Т. 24, № 2. С. 257-260. [Kartashova O.L., Pashkova T.M., Pashinina O.A., Morozova N.V. Anti-cytokine activity and ability to produce cytokine-like substances of staphylococci isolated from prostatic secretion in men with symptoms of urogenital infection. *Rossiyskiy immunologicheskii zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2021, Vol. 24, no. 2, pp. 257-260. (In Russ.)] doi: 10.46235/1028-7221-995-AAA.

7. Кузьмин М.Д., Пашкова Т.М., Карташова О.Л., Пашина О.А., Попова Л.П. Биологические свойства микроорганизмов, выделенных из мочи при мочекаменной болезни // Урология, 2018. № 4. С. 14-18. [Kuzmin M.D., Pashkova T.M., Kartashova O.L., Pashinina O.A., Popova L.P. Biological properties of microorganisms isolated from urine in urolithiasis. *Urologiya = Urology*, 2018, no. 4, pp. 14-18. (In Russ.)]

8. Пашина О.А., Пашкова Т.М., Карташова О.Л., Морозова Н.В. Антицитокиновая активность грибов рода *Candida* и их способность к продукции цитокиноподобных веществ // Российский иммунологический журнал, 2023. Т. 26, № 1. С. 57-62. [Pashinina O.A., Pashkova T.M., Kartashova O.L., Morozova N.V. Anti-cytokine activity of *Candida* fungi and their ability to produce cytokine-like substances. *Rossiyskiy immunologicheskii zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2023, Vol. 26, no. 1, pp. 57-62. (In Russ.)] doi: 10.46235/1028-7221-1150-AAO.

9. Пашина О.А., Карташова О.Л., Пашкова Т.М., Гриценко В.А., Зурочка А.В. Влияние синтетического аналога активного центра ГМ-КСФ – пептида ZP2 на антицитокиновую активность грибов рода *Candida* и их способность к продукции цитокиноподобных веществ // Вестник Уральской медицинской академической науки, 2022. Т. 19, № 3. С. 263-272. [Pashinina O.A., Kartashova O.L., Pashkova T.M., Gricenko V.A., Zurochka A.V. The effect of a synthetic analogue of the active center of GM-CSF – peptide ZP2 on the anti-cytokine activity of *Candida* fungi and their ability to produce cytokine-like substances. *Vestnik Uralskoy meditsinskoy akademicheskoy nauki = Bulletin of the Ural Medical Academic Science*, 2022, Vol. 19, no. 3, pp. 263-272. (In Russ.)]

10. Пашина О.А., Карташова О.Л., Пашкова Т.М., Гриценко В.А. Влияние синтетического аналога активного центра ГМ-КСФ – пептида ZP2 на антицитокиновую активность бактерий рода *Enterococcus* и их способность к продукции цитокиноподобных веществ // Российский иммунологический журнал, 2022. Т. 25, № 4. С. 477-484. [Pashinina O.A., Kartashova O.L., Pashkova T.M., Gricenko V.A. The effect of a synthetic analogue of the active center of GM-CSF – peptide ZP2 on the anti-cytokine activity of bacteria of the genus *Enterococcus* and their ability to produce cytokine-like substances. *Rossiyskiy immunologicheskii zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2022, Vol. 25, no. 4, pp. 477-484. (In Russ.)] doi: 10.46235/1028-7221-1162-IOZ.

Авторы:

Пашина О.А. — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории персистенции и симбиоза микроорганизмов Института клеточного и внутриклеточного симбиоза Уральского отделения Российской академии наук — обособленного структурного подразделения ФГБУН «Оренбургский федеральный исследовательский центр» Уральского отделения Российской академии наук, г. Оренбург, Россия

Пашкова Т.М. — д.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории персистенции и симбиоза микроорганизмов Института клеточного и внутриклеточного симбиоза Уральского отделения Российской академии наук — обособленного структурного подразделения ФГБУН «Оренбургский федеральный исследовательский центр» Уральского отделения Российской академии наук, г. Оренбург, Россия

Гриценко В.А. — д.м.н., профессор, главный научный сотрудник лаборатории персистенции и симбиоза микроорганизмов Института клеточного и внутриклеточного симбиоза Уральского отделения Российской академии наук — обособленного структурного подразделения ФГБУН «Оренбургский федеральный исследовательский центр» Уральского отделения Российской академии наук, г. Оренбург, Россия

Authors:

Pashinina O.A., PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratory of Microbial Persistence and Symbiosis, Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, Orenburg Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Orenburg, Russian Federation

Pashkova T.M., PhD, MD (Biology), Leading Researcher, Laboratory of Microbial Persistence and Symbiosis, Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, Orenburg Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Orenburg, Russian Federation

Gritsenko V.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Chief Researcher, Laboratory of Microbial Persistence and Symbiosis, Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, Orenburg Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Orenburg, Russian Federation

Поступила 28.03.2025

Отправлена на доработку 09.04.2025

Принята к печати 25.05.2025

Received 28.03.2025

Revision received 09.04.2025

Accepted 25.05.2025

ПОКАЗАТЕЛИ ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА У БОЛЬНЫХ АБДОМИНАЛЬНЫМ СЕПСИСОМ С РАЗЛИЧНЫМ ИСХОДОМ

Осиков М.В.^{1,2}, Конашов А.Г.^{1,3}, Бойко М.С.¹, Гусев А.В.^{1,2},
Конашов В.А.^{1,3}

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

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

³ ГАУЗ ОЗП «Городская клиническая больница № 8 г. Челябинск», г. Челябинск, Россия

Резюме. Врожденный иммунитет играет критическую роль в раннем распознавании и реагировании на патогены, его изучение при абдоминальном сепсисе (АС) имеет значение для патогенеза, ранней диагностики, прогноза, терапевтической стратегии. Цель — исследовать показатели врожденного иммунитета в динамике АС с различным исходом. Исследование проведено на 64 больных с АС в возрасте 32-82 лет, которых разделили на группы: группа 1 (n = 46) с благоприятным исходом и группа 2 (n = 18) с летальным исходом. Исследования проводили на 1-е, 3-и и 7-е сутки. Общее количество лейкоцитов исследовали на гематологическом анализаторе Sysmex XT-1800i/XT-2000i (Япония), функциональную активность нейтрофилов — по активности и интенсивности фагоцитоза, кислородзависимому метаболизму. Для статистического исследования использовали программу Statistica 10.0 for Windows. Установлено, что у пациентов с АС в динамике 1-7-х суток наблюдения независимо от исхода в крови увеличивается количество метамиелоцитов, палочкоядерных, сегментоядерных нейтрофилов; при неблагоприятном исходе АС нейтрофильный лейкоцитоз более выражен, увеличивается количество моноцитов и эозинофилов. У пациентов с АС независимо от исхода увеличивается поглотительная способность нейтрофилов крови, кислород-зависимый метаболизм в спонтанном режиме, угнетается кислород-зависимый метаболизм в индуцированном режиме; при неблагоприятном исходе АС наблюдается эскалация роста поглотительной способности нейтрофилов крови на 1-7-е сутки наблюдения, на фоне угнетения кислород-зависимого метаболизма нейтрофилов в спонтанном и индуцированном режимах преимущественно на 3-и и 7-е сутки наблюдения.

Ключевые слова: абдоминальный сепсис, исход, нейтрофилы, фагоцитоз, кислород-зависимый метаболизм

Адрес для переписки:

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

Address for correspondence:

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

Образец цитирования:

М.В. Осиков, А.Г. Конашов, М.С. Бойко, А.В. Гусев,
В.А. Конашов «Показатели врожденного иммунитета
у больных абдоминальным сепсисом с различным
исходом» // Российский иммунологический журнал,
2025. Т. 28, № 3. С. 673-680.
doi: 10.46235/1028-7221-17215-IOI

© Осиков М.В. и соавт., 2025

Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

M.V. Osikov, A.G. Konashov, M.S. Boyko, A.V. Gusev,
V.A. Konashov "Indexes of innate immunity in patients with
abdominal sepsis with different outcomes", Russian Journal
of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2025,
Vol. 28, no. 3, pp. 673-680.
doi: 10.46235/1028-7221-17215-IOI

© Osikov M.V. et al., 2025

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

DOI: 10.46235/1028-7221-17215-IOI

INDEXES OF INNATE IMMUNITY IN PATIENTS WITH ABDOMINAL SEPSIS WITH DIFFERENT OUTCOMES

Osikov M.V.^{a, b}, Konashov A.G.^{a, c}, Boyko M.S.^a, Gusev A.V.^{a, b},
Konashov V.A.^{a, c}

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

^b Chelyabinsk Regional Clinical Hospital, Chelyabinsk, Russian Federation

^c City Clinical Hospital No. 8, Chelyabinsk, Russian Federation

Abstract. Innate immunity plays a critical role in early recognition and response to pathogens, and its study in abdominal sepsis (AS) is important for pathogenesis, early diagnosis, prognosis, and therapeutic strategy. The aim of our study was to search for indices of innate immunity in the dynamics of AS dependent on its clinical outcomes. The study was conducted in a group of 64 patients with AS aged 32-82 years, who were divided in two groups: (1) 46 patients with a favorable outcome, and (2) 18 cases with a fatal outcome. The studies were conducted on days 1, 3, and 7. The total number of leukocytes was examined using a Sysmex XT-1800i/XT-2000i hematology analyzer (Japan); functional activity of neutrophils was measured by phagocytosis activity and intensity, and oxygen-dependent metabolism. The program "Statistica 10.0 for Windows" was used for statistical evaluation. It was found that, in AS patients, the number of metamyelocytes, rod-shaped, segmented neutrophils increases in the blood within 1-7 days of follow-up, regardless of clinical outcome; in cases of negative outcome of AS, neutrophilic leukocytosis is more pronounced, and the number of monocytes and eosinophils increases. In patients with AS, regardless of the outcome, the absorption capacity of blood neutrophils increases, along with increased oxygen-dependent metabolism in spontaneous mode, and its inhibition in induced mode. In cases of unfavorable outcome of AS, we observed elevation of absorption capacity of blood neutrophils on days 1-7 of follow-up, along with inhibition of oxygen-dependent neutrophil metabolism in spontaneous and induced modes, mainly, on days 3 and 7 of follow-up.

Keywords: abdominal sepsis, outcome, neutrophils, phagocytosis, oxygen-dependent metabolism

Введение

Абдоминальный сепсис (АС) — это синдром, в основе которого лежит системная воспалительная реакция организма на интраабдоминальную инфекцию, приводящий к острой органной дисфункции; смертность при АС составляет от 7,6 до 36% [5, 6]. Врожденный иммунитет играет критическую роль в раннем распознавании и реагировании на патогены, его изучение при АС имеет значение для понимания патогенеза, ранней диагностики и прогнозирования исходов, выбора терапевтической стратегии. Цель — исследовать показатели врожденного иммунитета в динамике АС с различным исходом.

Материалы и методы

Проведен поперечный срез сплошным методом выборки по мере госпитализации пациентов с абдоминальной хирургической патологией в отделение реанимации и интенсивной терапии ГБУЗ ОЗП «ГКБ № 8 г. Челябинск», которым предварительно выполнено оперативное лечение с санацией первичного очага в течение 1-х суток госпитализации. У всех пациентов диагностиро-

ван сепсис в соответствии с концепцией «Сепсис-3» [10, 11]. Исследование проведено на 64 больных с АС в возрасте 32-82 лет в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации «Этические принципы научных и медицинских исследований с участием человека» от 1964 года с дополнениями 2013 года и одобрено этическим комитетом ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России (протокол № 10 от 02.11.2023). В соответствии с исходом АС выделена группа 1 (n = 46) с благоприятным исходом и группа 2 (n = 18) с летальным исходом. Исследования проводили на 1-е, 3-и и 7-е сутки. Для определения общего количества лейкоцитов использовали гематологический анализатор Sysmex XT-1800i/XT-2000i (Япония). Нейтрофилы выделяли на градиенте плотности фиколл-урографина и проводили оценку их функциональной активности по активности и интенсивности фагоцитоза, кислородзависимого метаболизма (активность и интенсивность спонтанного и индуцированного НСТ-теста) [2]. Статистическую обработку данных проводили с помощью пакета программ Statistica 10.0 for Windows. Статистически значимыми считали отличия при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

У пациентов с благоприятным исходом АС исследование лейкоцитарной формулы в сравнении с группой здоровых лиц выявило увеличение на 1-е, 3-и и 7-е сутки общего количества лейкоцитов за счет палочкоядерных и сегментоядерных нейтрофилов, а также юных нейтрофилов на 1-е и 3-и сутки (табл. 1). В динамике наблюдения количество юных нейтрофилов на 3-и сутки меньше, чем на 1-е сутки, на 7-е сутки меньше, чем на 1-е и 3-и сутки; количество палочкоядерных нейтрофилов на 3-и и 7-е сутки меньше, чем на 1-е сутки; количество эозинофилов на 3-и и 7-е сутки больше, чем на 1-е сутки. При АС с неблагоприятным исходом исследование количественного состава лейкоцитов в крови в сравнении с группой здоровых лиц выявило на 1-е, 3-и и 7-е сутки увеличение общего количества лейкоцитов за счет юных, палочкоядерных и сегментоядерных нейтрофилов, на 1-е и 7-е сутки — моноцитов. В динамике наблюдения зафиксировано, что общее количество нейтрофилов, в том числе сегментоядерных нейтрофилов на 3-и сутки меньше, чем на 1-е сутки, на 7-е сутки больше, чем на 1-е и 3-и сутки; количество юных нейтрофилов на 3-и сутки меньше, чем на 1-е сутки, на 7-е сутки больше, чем на 3-и сутки; количество палочкоядерных нейтрофилов и моноцитов на 3-и сутки меньше, чем на 1-е сутки, на 7-е сутки больше, чем на 3-и сутки; количество эозинофилов на 7-е сутки меньше, чем на 1-е и 3-и сутки. Сравнительная характеристика количественного состава лейкоцитов в группах 1 и 2 показала, что у пациентов с неблагоприятным исходом АС в отличие от группы пациентов с благоприятным исходом АС общее количество лейкоцитов больше за счет юных, палочкоядерных и сегментоядерных нейтрофилов на 1-е, 3-и и 7-е сутки; моноцитов и эозинофилов — на 1-е сутки.

Оценка функциональной активности нейтрофилов крови в группе пациентов с благоприятным исходом АС в сравнении с группой здоровых лиц выявила снижение активности фагоцитоза на 1-е сутки, увеличение интенсивности фагоцитоза на 3-и сутки, увеличение активности спонтанного НСТ-теста на 1-е и 3-и сутки, увеличение интенсивности спонтанного НСТ-теста на 3-и сутки, снижение активности индуцированного НСТ-теста на 3-и и 7-е сутки, снижение интенсивности индуцированного НСТ-теста на 1-е и 7-е сутки (табл. 2). В динамике наблюдения выявлено, что активность фагоцитоза нейтрофилов на 3-и и 7-е сутки выше, чем на 1-е сутки; интенсивность фагоцитоза нейтрофилов и интенсивность индуцированного НСТ-теста на 3-и сутки выше, чем на 1-е сутки, на 7-е сутки выше, чем на 1-е сутки, ниже, чем на 3-и сутки; активность

спонтанного НСТ-теста на 3-и сутки выше, чем на 1-е сутки, на 7-е сутки ниже, чем на 1-е и 3-и сутки; интенсивность спонтанного НСТ-теста на 3-и сутки выше, чем на 1-е сутки, на 7-е сутки выше, чем на 1-е сутки, ниже, чем на 3-и сутки; активность индуцированного НСТ-теста на 3-и сутки ниже, чем на 1-е сутки, на 7-е сутки ниже, чем на 1-е и 3-и сутки.

При оценке функциональной активности нейтрофилов крови у пациентов с неблагоприятным исходом АС в сравнении с группой здоровых пациентов выявлено увеличение активности и интенсивности фагоцитоза на 1-е, 3-и и 7-е сутки, увеличение активности спонтанного НСТ-теста на 1-е и 3-и сутки, уменьшение интенсивности спонтанного НСТ-теста на 1-е сутки и увеличение на 3-и сутки, уменьшение активности индуцированного НСТ-теста на 7-е сутки, интенсивности индуцированного НСТ-теста на 1-е сутки. В динамике наблюдения зафиксировано, что активность фагоцитоза нейтрофилов на 3-и сутки ниже, чем на 1-е сутки, на 7-е сутки ниже, чем на 1-е сутки, но выше, чем на 3-и сутки; интенсивность фагоцитоза нейтрофилов на 3-и сутки выше, чем на 1-е сутки, на 7-е сутки выше, чем на 1-е сутки, но ниже, чем на 3-и сутки; активность спонтанного и индуцированного НСТ-теста на 3-и сутки выше, чем на 1-е сутки, на 7-е сутки ниже, чем на 1-е и 3-и сутки; интенсивность спонтанного НСТ-теста на 3-и сутки выше, чем на 1-е сутки, на 7-е сутки выше, чем на 1-е сутки, ниже, чем на 3-и сутки, интенсивность индуцированного НСТ-теста на 3-и и 7-е сутки выше, чем на 1-е сутки.

Сравнительная характеристика функциональной активности нейтрофилов крови в группах 1 и 2 выявила, что у пациентов с неблагоприятным исходом АС в отличие от группы с благоприятным исходом АС активность фагоцитоза нейтрофилов выше на 1-е сутки, ниже на 3-и и 7-е сутки, интенсивность фагоцитоза нейтрофилов выше на 1-е, 3-и и 7-е сутки, активность спонтанного и интенсивность индуцированного НСТ-теста ниже на 1-е и 3-е сутки, интенсивность спонтанного НСТ-теста ниже на 3-и сутки, активность индуцированного НСТ-теста ниже на 1-е сутки, выше на 3-и и 7-е сутки.

Таким образом, анализ клеточного состава и функциональной активности клеток врожденного иммунитета при АС выявил увеличение в крови количества нейтрофилов различной степени зрелости: метамиелоцитов, палочкоядерных и сегментоядерных нейтрофилов, активацию поглощательной способности и кислородзависимого метаболизма нейтрофилов крови с ограничением их функционального резерва в связи со снижением показателей индуцированного НСТ-теста.

ТАБЛИЦА 1. КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ СОСТАВ ЛЕЙКОЦИТОВ У ПАЦИЕНТОВ С РАЗЛИЧНЫМ ИСХОДОМ АС, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)
TABLE 1. QUANTITATIVE COMPOSITION OF LEUKOCYTES IN PATIENTS WITH DIFFERENT OUTCOMES OF AS, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

Показатели Indicators	Здоровые Healthy (n = 10)	1-я группа. Пациенты с благоприятным исходом АС Group 1. Patients with a favorable outcome of AS (n = 16)				2-я группа. Пациенты с неблагоприятным исходом АС Group 2. Patients with an unfavorable outcome of AS (n = 6)			
		1-е сутки 1 st day (n = 8)	3-и сутки 3 rd day (n = 10)	7-е сутки 7 th day (n = 6)	1-е сутки 1 st day (n = 6)	3-и сутки 3 rd day (n = 6)	7-е сутки 7 th day (n = 6)	1-е сутки 1 st day (n = 6)	3-и сутки 3 rd day (n = 6)
Лейкоциты, $\times 10^9/\text{л}$ WBC, $\times 10^9/\text{L}$	5,06 (4,45-7,16)	10,65 (8,46-12,34)*	9,24 (8,24-11,64)*	10,15 (8,43-11,76)*	21,55 (20,01-23,54)**	23,15 (20,03-25,46)**	26,54 (20,45-27,51)*#	21,55 (20,01-23,54)**	23,15 (20,03-25,46)**
Нейтрофилы, $\times 10^9/\text{л}$ Neutrophils, $\times 10^9/\text{L}$	2,9 (2,2-4,0)	9,18 (6,97-10,79)*	7,24 (6,38-9,16)*	8,09 (6,65-9,38)*	18,87 (16,39-18,59)**	12,09 (8,38-13,36)**\$	24,57 (19,47-24,59)*#&	18,87 (16,39-18,59)**	12,09 (8,38-13,36)**\$
Юные нейтрофилы, $\times 10^9/\text{л}$ Young neutrophils, $\times 10^9/\text{L}$	0,01 (0,00-0,05)	0,19 (0,12-0,23)*	0,08 (0,05-0,11)*\$	0,01 (0,01-0,02)\$&	0,71 (0,48-1,01)**	0,28 (0,19-0,42)**\$	0,62 (0,42-0,82)**&	0,71 (0,48-1,01)**	0,28 (0,19-0,42)**\$
Палочкоядерные нейтрофилы, $\times 10^9/\text{л}$ Rod-shaped neutrophils, $\times 10^9/\text{L}$	0,15 (0,01-0,39)	1,45 (1,18-1,76)*	0,91 (0,71-1,01)*\$	0,65 (0,49-0,83)\$	3,69 (3,24-4,34)**	1,74 (1,25-2,14)**\$	3,35 (2,25-3,51)**&	3,69 (3,24-4,34)**	1,74 (1,25-2,14)**\$
Сегментоядерные нейтрофилы, $\times 10^9/\text{л}$ Segmented neutrophils, $\times 10^9/\text{L}$	5,72 (3,49-6,43)	8,01 (6,93-10,57)*	8,26 (7,24-8,63)*	9,49 (7,81-11,25)*	15,19 (15,69-18,93)**	11,14 (10,28-13,39)**\$	21,59 (19,96-24,06)*#&	15,19 (15,69-18,93)**	11,14 (10,28-13,39)**\$
Моноциты, $\times 10^9/\text{л}$ Monocytes, $\times 10^9/\text{L}$	0,31 (0,14-0,59)	0,68 (0,48-0,82)	0,72 (0,51-0,98)	0,62 (0,45-0,87)	1,08 (1,03-1,27)*#	0,61 (0,43-0,91)\$	1,25 (0,85-1,71)*&	1,08 (1,03-1,27)*#	0,61 (0,43-0,91)\$
Базофилы, $\times 10^9/\text{л}$ Basophils, $\times 10^9/\text{L}$	0,03 (0,01-0,04)	0,01 (0,01-0,02)	0,01 (0,01-0,02)	0,01 (0,01-0,02)	0,03 (0,02-0,04)	0,02 (0,01-0,03)	0,03 (0,02-0,04)	0,03 (0,02-0,04)	0,02 (0,01-0,03)
Эозинофилы, $\times 10^9/\text{л}$ Eosinophils, $\times 10^9/\text{L}$	0,13 (0,01-0,15)	0,01 (0,01-0,03)	0,12 (0,09-0,16)\$	0,14 (0,05-0,25)\$	0,14 (0,10-0,17)#	0,11 (0,06-0,12)	0,04 (0,02-0,05)\$&	0,14 (0,10-0,17)#	0,11 (0,06-0,12)

Примечание. * – статистически значимые $p < 0,05$ отличия с группой здоровых; # – различия между 1-й и 2-й группой; \$ – различия в соответствующей группе на 1-е сутки; & – различия в соответствующей группе на 3-и сутки. ИГ – индекс Гаркави.

Note. *, statistically significant $p < 0.05$ differences with the healthy group; #, differences between the 1st and 2nd groups; \$, differences in the corresponding group on day 1; &, differences in the corresponding group on day 3.

ТАБЛИЦА 2. ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ НЕЙТРОФИЛОВ КРОВИ У ПАЦИЕНТОВ С РАЗЛИЧНЫМ ИСХОДОМ АС, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})
TABLE 2. FUNCTIONAL ACTIVITY OF BLOOD NEUTROPHILS IN PATIENTS WITH DIFFERENT OUTCOMES OF AS, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

Показатели Indicators	Здоровые Healthy (n = 10)	1-я группа. Пациенты с благоприятным исходом АС Group 1. Patients with a favorable outcome of AS (n = 16)				2-я группа. Пациенты с неблагоприятным исходом АС Group 2. Patients with an unfavorable outcome of AS (n = 6)			
		1-е сутки 1 st day (n = 8)	3-и сутки 3 rd day (n = 10)	7-е сутки 7 th day (n = 6)	1-е сутки 1 st day (n = 6)	3-и сутки 3 rd day (n = 10)	7-е сутки 7 th day (n = 6)	1-е сутки 1 st day (n = 6)	3-и сутки 3 rd day (n = 10)
Фагоцитоз (активность), % Phagocytosis (activity), %	54,61 (52,46-59,49)	44,25 (42,00-46,00)*	54,10 (50,00-57,00) ^{\$}	50,58 (50,00-51,00) ^{\$}	72,21 (72,00-72,30)* [#]	32,83 (32,00-33,00)* ^{##}	44,16 (43,00-45,00)* ^{##\$}		
Фагоцитоз (интенсивность), у. е. Phagocytosis (intensity), c. u.	1,74 (1,52-1,86)	1,55 (1,55-1,57)	2,91 (2,85-2,96)* ^{\$}	1,61 (1,59-1,61) ^{\$}	3,12 (3,10-3,16)* [#]	5,25 (5,00-5,25)* ^{##}	4,31 (4,30-4,32)* ^{##\$}		
НСТ-тест спонтанный (активность), % NBT test is spontaneous (activity), %	12,61 (10,67-14,92)	26,00 (25,00-27,00)*	33,40 (33,00-34,00)* ^{\$}	10,91 (10,00-12,00) ^{\$}	21,83 (21,00-22,00)* [#]	31,33 (31,00-32,00)* ^{##}	12,83 (12,00-13,00) ^{\$}		
НСТ-тест спонтанный (интенсивность), у. е. NBT test is spontaneous (intensity), c. u.	0,12 (0,11-0,15)	0,09 (0,09-0,10)	0,41 (0,39-0,41)* ^{\$}	0,11 (0,11-0,12) ^{\$}	0,08 (0,07-0,09)*	0,24 (0,24-0,26)* ^{##}	0,13 (0,12-0,13) ^{\$}		
НСТ-тест индуцированный (активность), % NBT-induced test (activity), %	42,46 (30,46-54,16)	36,37 (36,00-37,00)	27,60 (27,00-28,00)* ^{\$}	21,25 (21,00-22,00)* ^{\$}	31,00 (30,00-32,00)* [#]	42,83 (42,00-44,00)* ^{##}	16,33 (16,00-17,00)* ^{##\$}		
НСТ-тест индуцированный (интенсивность), у. е. NBT-induced test (intensity), c. u.	0,93 (0,49-1,47)	0,27 (0,27-0,29)*	0,67 (0,66-0,69) ^{\$}	0,31 (0,30-0,32)* ^{\$}	0,14 (0,14-0,15)* [#]	0,55 (0,54-0,56)* ^{##}	0,32 (0,30-0,36) ^{\$}		

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. As for Table 1.

Эти изменения отражают участие нейтрофилов как основных клеток врожденного иммунитета в противоинфекционной защите при АС и вероятность развития вторичных инфекционных, внутригоспитальных осложнений, синдрома системной воспалительной реакции [1, 3, 12].

У больных с благоприятным прогнозом АС количество в крови субпопуляций нейтрофилов меньше, чем у пациентов с неблагоприятным прогнозом. Кроме этого, при неблагоприятном исходе АС в крови увеличивается количество моноцитов. Показано, что при АС часть зрелых нейтрофилов погибает путем апоптоза, стимуляция миелоидного ростка костного мозга приводит к увеличению количества незрелых нейтрофилов в крови [7]. Гиперактивация нейтрофилов провоспалительными медиаторами при АС приводит к высвобождению большого количества цитокинов, дефенсинов, активных форм кислорода (АФК), что приводит к повреждению тканей организма-хозяина, развитию полиорганной недостаточности [9, 13]. Патогенную роль при АС несет не общее количество нейтрофилов, а наличие их гиперактивной субпопуляции, участвующей в повреждении тканей [8]. В этом отношении особое значение имеют незрелые нейтрофилы (метамиелоциты, палочкоядерные формы), которые обладают повышенными адгезивными свойствами, легко проникают в ткани, где высвобождают активные формы кислорода [4, 9].

В группе пациентов с неблагоприятным исходом АС отмечалась высокая активность и интенсивность фагоцитоза, а также активность и интенсивность спонтанного НСТ-теста, что связано с усилением окислительного метаболизма в активированных фагоцитах (респираторный взрыв) с образованием первичных (супероксид-

ный анион, перекись водорода, гидроксильный радикал, синглетный кислород) и вторичных (гипохлорная кислота, хлорамин, продукты перекисного окисления липидов) метаболитов, обладающих мощной бактерицидной активностью. К 7-м суткам активность и интенсивность спонтанного НСТ-теста восстанавливается, а функциональный резерв нейтрофилов по показателям интенсивности индуцированного НСТ-теста снижается. Данные изменения отражают дефекты кислородзависимых механизмов микробоцидности и могут служить прогностическим критерием неблагоприятного исхода при АС.

Выводы

1. Установлено, что у пациентов с АС в динамике 1-7-х суток наблюдения, независимо от исхода, в крови увеличивается количество метамиелоцитов, палочкоядерных, сегментоядерных нейтрофилов; в сравнительном аспекте при неблагоприятном исходе АС нейтрофильный лейкоцитоз более выражен на 1-7-е сутки наблюдения, увеличивается количество моноцитов на 3-и сутки наблюдения.

2. У пациентов с АС, независимо от исхода, увеличивается поглотительная способность нейтрофилов крови, кислород-зависимый метаболизм в спонтанном режиме, угнетается кислород-зависимый метаболизм в индуцированном режиме; в сравнительном аспекте при неблагоприятном исходе АС наблюдается эскалация роста поглотительной способности нейтрофилов крови на 1-7-е сутки наблюдения на фоне угнетения кислород-зависимого метаболизма нейтрофилов в спонтанном и индуцированном режимах преимущественно на 3-и и 7-е сутки наблюдения.

Список литературы / References

1. Стрельцова Е.И., Пешкова И.В., Саматов И.Ю., Валеева В.А., Верещагин Е.И. Лимфопения как фактор, определяющий тяжесть сепсиса, как точный критерий диагностики и как объект терапии // *Journal of Siberian Medical Sciences*, 2020. № 3. С. 108-125. [Streltsova E.I., Peshkova I.V., Samatov I.Yu., Valeeva V.A., Vereshchagin E.I. Lymphopenia as a factor determining the severity of sepsis, as an accurate diagnostic criterion and as an object of therapy. *Journal of Siberian Medical Sciences = Journal of Siberian Medical Sciences*, 2020, no. 3, pp. 108-125.
2. Фрейдлин И.С. Методы изучения фагоцитирующих клеток при оценке иммунного статуса человека: учебное пособие. Л., 1986. 37 с. [Freidlin I.S. Methods of studying phagocytic cells in the assessment of human immune status: textbook]. Leningrad, 1986. 37 p.
3. Jarczak D., Nierhaus A. Cytokine storm-definition, causes, and implications. *Int. J. Mol. Sci.*, 2022, Vol. 23, no. 19, 11740. doi: 10.3390/ijms231911740.
4. Liu S., Li Y., She F., Zhao X., Yao Y. Predictive value of immune cell counts and neutrophil-to-lymphocyte ratio for 28-day mortality in patients with sepsis caused by intra-abdominal infection. *Burns Trauma*, 2021, Vol. 9, tkaa040. doi: 10.1093/burnst/tkaa040.
5. Locati M., Curtale G., Mantovani A. Diversity, mechanisms, and significance of macrophage plasticity. *Annu. Rev. Pathol.*, 2020, Vol. 15, pp. 123-147.
6. Lu J., Liu J., Zhu L., Zhang Y., Li A. The effect of age on the clinical characteristics and innate immune cell function in the patients with abdominal sepsis. *Front. Physiol.*, 2022, Vol. 13, 952434. doi: 10.3389/fphys.2022.952434.

7. Nedeва C., Menassa J., Duan M., Liu C., Doerflinger M., Kueh A.J., Herold M.J., Fonseka P., Phan T.K., Faou P., Rajapaksha H., Chen W., Hulett M.D., Puthalakath H. TREML4 receptor regulates inflammation and innate immune cell death during polymicrobial sepsis. *Nat. Immunol.*, 2020, Vol. 21, no. 12, pp. 1585-1596.
8. Ramoni D., Tirandi A., Montecucco F., Liberale L. Sepsis in elderly patients: the role of neutrophils in pathophysiology and therapy. *Intern. Emerg. Med.*, 2024, Vol. 19, no. 4, pp. 901-917.
9. Scozzi D., Liao F., Krupnick A.S., Kreisel D., Gelman A.E. The role of neutrophil extracellular traps in acute lung injury. *Front. Immunol.*, 2022, Vol. 13, 953195. doi: 10.3389/fimmu.2022.953195.
10. Singer M., Deutschman C.S., Seymour C.W., Shankar-Hari M., Annane D., Bauer M., Bellomo R., Bernard G.R., Chiche J.D., Coopersmith 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.
11. Vincent J.L., Moreno R., Takala J., Willatts S., De Mendonça A., Bruining H., Reinhart C.K., Suter P.M., Thijs L.G. The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. On behalf of the Working Group on Sepsis-Related Problems of the European Society of Intensive Care Medicine. *Intensive Care Med*, 1996, Vol. 22, no. 7, pp. 707-710.
12. Wiersinga W.J., van der Poll T. Immunopathophysiology of human sepsis. *EBioMedicine*, 2022, Vol. 86, 104363. doi: 10.1016/j.ebiom.2022.104363.
13. Zhang H., Wang Y., Qu M., Li W., Wu D., Cata J.P., Miao C. Neutrophil, neutrophil extracellular traps and endothelial cell dysfunction in sepsis. *Clin. Transl. Med.*, 2023, Vol. 13, no. 1, e1170. doi: 10.1002/ctm2.1170.

Авторы:

Осиков М.В. — д.м.н., профессор, заведующий кафедрой патофизиологии, начальник управления по научной и инновационной работе ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет»; начальник отдела научной работы ГБУЗ «Челябинская областная клиническая больница», г. Челябинск, Россия

Конашов А.Г. — к.м.н., доцент кафедры патофизиологии ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет»; заместитель главного врача по лечебной части, врач — анестезиолог-реаниматолог высшей категории ГАУЗ ОЗП «Городская клиническая больница № 8 г. Челябинск», г. Челябинск, Россия

Authors:

Osikov M.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Pathophysiology, Head of the Department for Scientific and Innovative Work, South Ural State Medical University; Head, Department of Research, Chelyabinsk Regional Clinical Hospital, Chelyabinsk, Russian Federation

Konashov A.G., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Pathophysiology, South Ural State Medical University; Deputy Chief Physician for the Medical Unit, Anesthesiologist-Intensive Care, City Clinical Hospital No. 8, Chelyabinsk, Russian Federation

Бойко М.С. — к.м.н., доцент кафедры патофизиологии
ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный
медицинский университет», г. Челябинск, Россия

Гусев А.В. — ассистент кафедры патофизиологии
ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный
медицинский университет»; врач — анестезиолог-
реаниматолог ГБУЗ «Челябинская областная
клиническая больница», г. Челябинск, Россия

Конашов В.А. — ассистент кафедры патофизиологии
ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный
медицинский университет»; врач-стажер отделения
реанимации и интенсивной терапии ГАУЗ ОЗП
«Городская клиническая больница № 8 г. Челябинск»,
г. Челябинск, Россия

Boyko M.S., PhD (Medicine), Associate Professor,
Department of Pathophysiology, South Ural State Medical
University, Chelyabinsk, Russian Federation

Gusev A.V., Assistant Professor, Department of
Pathophysiology, South Ural State Medical University;
Anesthesiologist-Intensive Care, Chelyabinsk Regional Clinical
Hospital, Chelyabinsk, Russian Federation

Konashov V.A., Assistant Professor, Department of
Pathophysiology, South Ural State Medical University; Trainee
Physician, Intensive Care Unit, City Clinical Hospital No. 8,
Chelyabinsk, Russian Federation

Поступила 01.04.2025
Отправлена на доработку 06.05.2025
Принята к печати 25.05.2025

Received 01.04.2025
Revision received 06.05.2025
Accepted 25.05.2025

ОЦЕНКА УРОВНЕЙ IL-6 И IL-8 ПРИ ВНЕБОЛЬНИЧНОЙ ПНЕВМОНИИ У ДЕТЕЙ

Аникеева Н.А.¹, Жулева А.Ю.¹, Белых Н.А.¹,
Абаленихина Ю.В.¹, Паринская Е.С.²

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

² ГБУ РО «Городская клиническая больница № 11», г. Рязань, Россия

Резюме. Поиск биомаркеров тяжелого течения внебольничных пневмоний у детей является актуальной клинической задачей. Цитокины, в частности IL-6 и IL-8, являясь регуляторами иммунного ответа, могут рассматриваться в качестве индикаторов воспаления легочной ткани. Целью исследования явилась оценка уровней IL-6 и IL-8 в сыворотке крови у детей с пневмонией с учетом тяжести заболевания и анализ взаимосвязи этих параметров с характером патологии и биомаркерами системного воспаления. Иммуноферментным методом определялись концентрации IL-6, IL-8 и прокальцитонина в сыворотке крови 37 детей с внебольничной пневмонией разной тяжести при их поступлении в стационар. Обследованные дети были разделены на 2 группы: 1 — пациенты с тяжелой пневмонией ($n = 13$) и 2 — пациенты с нетяжелой пневмонией ($n = 24$). Установлено, что сывороточные уровни обоих интерлейкинов были выше у детей с тяжелой внебольничной пневмонией. Так, у детей с тяжелым течением заболевания уровень IL-6 в 2,2 раза, а уровень IL-8 в 3,6 раза превышали показатели пациентов с нетяжелым течением пневмонии. Выявлено наличие прямых корреляционных связей средней силы между тяжестью заболевания и сывороточными уровнями IL-6 ($r = 0,68$, $p < 0,0001$) и IL-8 ($r = 0,57$, $p < 0,0001$). Определено наличие корреляционных взаимосвязей изученных интерлейкинов как между собой ($r = 0,49$, $p = 0,002$), так и с другими индикаторами системного воспаления. Так, уровень IL-6 коррелировал с лейкоцитозом ($r = 0,42$, $p = 0,009$), абсолютным количеством нейтрофилов ($r = 0,49$, $p = 0,002$) и сывороточной концентрацией PCT ($r = 0,53$, $p < 0,001$), а уровень IL-8 — с концентрациями PCT ($r = 0,49$, $p = 0,002$) и CRP ($r = 0,35$, $p < 0,05$). Полученные результаты свидетельствуют о том, что развитие тяжелой внебольничной пневмонии у детей сопряжено с повышением в сыворотке крови уровней IL-6 и IL-8, а также таких лабораторных показателей системной воспалительной реакции, как лейкоцитоз, концентрации PCT и CRP. Выявленные взаимосвязи указывают на вовлеченность IL-6 и IL-8 в развитие системной воспалительной реакции, вызванной учащаемой патологией. Полученные данные указывают на возможность использования уровней IL-6 и IL-8 в сыворотке крови у детей с внебольничной пневмонией в качестве перспективных биомаркеров для оценки тяжести заболевания.

Ключевые слова: внебольничная пневмония, биомаркеры, дети, IL-6, IL-8

Адрес для переписки:

Аникеева Наталья Александровна
ФГБОУ ВО «Рязанский государственный медицинский
университет имени академика И.П. Павлова»
Министерства здравоохранения РФ
300026, Россия, г. Рязань, ул. Высоковольтная, 9.
Тел.: 8 (910) 509-14-86.
E-mail: natasha782@inbox.ru

Address for correspondence:

Nataliya A. Anikeeva
Ryazan State Medical University
9 Vysokovoltynaya St
Ryazan
300026 Russian Federation
Phone: +7 (910) 509-14-86.
E-mail: natasha782@inbox.ru

Образец цитирования:

Н.А. Аникеева, А.Ю. Жулева, Н.А. Белых,
Ю.В. Абаленихина, Е.С. Паринская «Оценка уровней
IL-6 и IL-8 при внебольничной пневмонии у детей»
// Российский иммунологический журнал, 2025. Т. 28,
№ 3. С. 681-686.
doi: 10.46235/1028-7221-17196-AOI

© Аникеева Н.А. и соавт., 2025

Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

N.A. Anikeeva, A. Yu. Zhuleva, N.A. Belykh,
Yu. V. Abalenikhina, E.S. Parinskaya "Assessment of IL-6 and
IL-8 levels in community-acquired pneumonia in children",
Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii
Zhurnal, 2025, Vol. 28, no. 3, pp. 681-686.
doi: 10.46235/1028-7221-17196-AOI

© Anikeeva N.A. et al., 2025

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

DOI: 10.46235/1028-7221-17196-AOI

ASSESSMENT OF IL-6 AND IL-8 LEVELS IN COMMUNITY-ACQUIRED PNEUMONIA IN CHILDREN

Anikeeva N.A.^a, Zhuleva A.Yu.^a, Belykh N.A.^a, Abalenikhina Yu.V.^a,
Parinskaya E.S.^b

^a Ryazan State Medical University, Ryazan, Russian Federation

^b City Clinical Hospital No. 11, Ryazan, Russian Federation

Abstract. The search for biomarkers of severe community-acquired pneumonia in children is an urgent clinical task. Cytokines, in particular IL-6 and IL-8, may be considered indices of lung tissue inflammation, being regulators of the immune response. The aim of the study was to evaluate serum levels of IL-6 and IL-8 in children with pneumonia of different severity, and to analyze the relationship of these parameters with origin of the pathology and biomarkers of systemic inflammation. The enzyme immunoassay method was used to determine the concentrations of IL-6, IL-8, and procalcitonin in blood serum samples of 37 children with community-acquired pneumonia of varying severity upon their admission to the hospital. The examined children were divided in 2 groups: (1) patients with severe pneumonia (n = 13); (2), patients with mild pneumonia (n = 24). It was found that the serum levels of both interleukins were higher in children with severe community-acquired pneumonia. Thus, in children with severe disease, the level of IL-6 is 2.2 times, and the level of IL-8 is 3.6 times higher than in patients with mild pneumonia. Positive correlations of moderate strength have been revealed between the severity of the disease and serum levels of IL-6 ($r = 0.68$, $p < 0.0001$) and IL-8 ($r = 0.57$, $p < 0.0001$). Significant correlations of the studied interleukins were found among the cytokine contents ($r = 0.49$, $p = 0.002$), and with other indices of systemic inflammation. IL-6 levels correlated with leukocytosis ($r = 0.42$, $p = 0.009$), absolute neutrophil counts ($r = 0.49$, $p = 0.002$), serum procalcitonin (PCT) concentration ($r = 0.53$, $p < 0.001$). IL-8 levels correlated with PCT concentrations ($r = 0.49$, $p = 0.002$) and CRP ($r = 0.35$, $p < 0.05$). Conclusions. The results obtained suggest that the development of severe community-acquired pneumonia in children is associated with increased serum levels of IL-6 and IL-8, as well as laboratory parameters of systemic inflammatory response such as leukocytosis, concentrations of PCT and CRP. The revealed correlations indicate the involvement of IL-6 and IL-8 in development of a systemic inflammatory response associated with this disorder. The data obtained suggest an opportunity of using serum IL-6 and IL-8 levels in children with community-acquired pneumonia as promising biomarkers for assessing the disease severity.

Keywords: community-acquired pneumonia, biomarkers, children, IL-6, IL-8

Введение

В современной педиатрической практике заболеваемость внебольничной пневмонией (ВП) связана с повышенной смертностью, высокой частотой госпитализаций, длительным пребыванием в стационаре и частым развитием осложнений [3]. Ранняя диагностика ВП может способствовать принятию верных клинических решений и улучшению прогноза. Для лабораторной оценки тяжести заболевания и прогнозирования его течения в клинической практике используются такие биомаркеры, как количество лейкоцитов, уровни прокальцитонина (PCT) и С-реактивного белка (CRP) в сыворотке крови [4]. Однако использование традиционных биомаркеров имеет ограниченное применение для диагностики и прогнозирования течения ВП у детей. Актуальным является поиск информативных индикаторов, позволяющих в дополнение к

клинической оценке существенно улучшить диагностику и тактику ведения детей с ВП, а также уменьшить неблагоприятные исходы, связанные с этим заболеванием. Такими маркерами могут стать цитокины, которые являются регуляторами иммунного ответа и играют существенную роль в патогенезе воспаления при ВП у детей [1].

Цитокины являются важнейшим связующим звеном между различными системами организма: иммунной, эндокринной, нервной, кроветворной, и осуществляют их взаимодействие в развитии реакций воспаления и иммунитета. Ведущими медиаторами инфекционного воспаления являются интерлейкин 6 (IL-6) и интерлейкин 8 (IL-8) [5].

IL-6 играет ключевую роль в регуляции как иммунных ответов, так и воспалительных реакций [7, 9]. В процессе инфицирования и повреждения тканей IL-6 реагирует быстрее, чем

лейкоциты и CRP [6]. Ряд авторов предлагает использовать данный маркер для прогнозирования течения пневмонии микоплазменной и аденовирусной этиологии у пациентов детского возраста [8, 10]. В некоторых исследованиях показано повышение уровня IL-6 при тяжелых пневмониях у детей [1].

В развитии воспалительного процесса активно участвует IL-8. Обладая высокой хемоаттрактантной активностью, он индуцирует хемотаксис лейкоцитов с последующей дегрануляцией нейтрофилов, вызывает выделение гистамина тучными клетками и стимулирует ангиогенез [5]. Предпринимаются попытки оценки изменений уровня IL-8 у детей с ВП [2].

Однако данных, подтверждающих ценность определения уровней IL-6 и IL-8 для диагностики, оценки тяжести и прогноза ВП у детей недостаточно.

Цель исследования — оценить уровни IL-6 и IL-8 в сыворотке крови у детей с ВП с учетом тяжести заболевания и проанализировать взаимосвязи этих параметров с характером патологии и биомаркерами системного воспаления.

Материалы и методы

Под наблюдением находились 37 детей с верифицированным согласно клиническим рекомендациям диагнозом «внебольничная пневмония». Критерии включения: возраст от 1 мес. до 17 лет 11 мес., верифицированный согласно клиническим рекомендациям диагноз «ВП», отсутствие антибактериальной терапии на амбулаторном этапе. Критерии исключения: возраст младше 1 мес. и/или старше 17 лет 11 мес., антибактериальная терапия на амбулаторном этапе, наличие заболеваний бронхолегочной системы и сопутствующей патологии, оказывающей влияние на респираторную функцию, наличие других воспалительных заболеваний. Клинико-лабораторное обследование больных и диагностику у них ВП осуществляли в соответствии с действующими клиническими рекомендациями [4]. Средний возраст больных составил $10,8 \pm 5,5$ лет, девочек с ВП было — 17 (45,9%), мальчиков — 20 (54,1%). Обследованные были разделены на 2 группы: 1 — пациенты с тяжелой ВП ($n = 13$) и 2 — пациенты с нетяжелой ВП ($n = 24$). Вакцинальный анамнез пациентов в обеих группах существенно не отличался: 6 (46,2%) детей 1-й группы и 10 (41,7%) детей 2-й группы были привиты от пневмококковой инфекции, 5 (38,5%) и 6 (25,0%) соответственно — от гемофильной инфекции и 1 (7,7%) и 3 (12,5%) — от гриппа.

У всех пациентов с ВП при госпитализации осуществляли забор крови и определение в сыворотке крови концентраций IL-6, IL-8 и PCT мето-

дом гетерогенного иммуноферментного анализа (ГИФА) с использованием коммерческих наборов Human IL-6 (Interleukin 6) ELISA Kit, Human IL-8 (Interleukin 8), Human PCT (Procalcitonin) (ELISA Kit (Wuhan Fine Biotech Co., Ltd (FineTest), Китай). Светопоглощение измеряли при 450 нм на иммуноферментном планшетном анализаторе Stat Fax 2100 (Awareness Technology, США). Концентрации в сыворотке крови интерлейкинов выражали в пг/мл, PCT — в нг/мл.

Определение уровня CRP в сыворотке крови осуществляли иммунотурбидиметрическим методом, используя наборы реагентов фирмы DiaSys (Германия). Измерения проводились на биохимическом анализаторе Sapphire 400 Premium (Япония). Концентрацию в сыворотке крови CRP выражали в мг/мл.

Количество лейкоцитов и нейтрофилов в крови пациентов оценивали по результатам общего анализа крови.

Статистическая обработка полученных данных осуществлялась с помощью пакета прикладных программ GraphPad Prism8. Для сравнения независимых выборок использовался критерий Манна—Уитни. Различия сравниваемых показателей принимались за достоверные при $p < 0,05$. Для выявления корреляционных взаимосвязей между признаками рассчитывали ранговые коэффициенты корреляции Спирмена (r) с оценкой уровня значимости (p).

Исследование соответствует положениям Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации об этических принципах проведения медицинских исследований с участием людей в качестве субъектов (2000), одобрено комитетом университета по этике (протокол № 5 заседания ЛЭК от 7.11.2023), от всех участников было получено информированное добровольное согласие. Авторский коллектив выражает благодарность руководству университета и сотрудникам ЦНИЛ за помощь в проведении исследования.

Результаты и обсуждение

Дети с ВП независимо от тяжести заболевания поступали в стационар на 6-7-е сутки от появления первых симптомов патологии. В клинической картине пациентов с ВП обеих групп преобладали симптомы поражения респираторного тракта и интоксикации. Однако у детей с тяжелым течением ВП (1-я группа) в сравнении с пациентами 2-й группы (нетяжелая ВП) достоверно чаще встречались такие симптомы интоксикации, как слабость (92,3 против 68,2%, $p = 0,038$), тахикардия (89,5 против 37,5%, $p < 0,0001$) и снижение аппетита (76,9 против 46,6%, $p = 0,006$), а также наблюдались проявления дыхательной недоста-

точности в виде снижения сатурации < 95% (53,8 против 4,2%, $p < 0,0001$), одышки смешанного типа с участием в акте дыхания вспомогательной мускулатуры (76,9 против 16,7%, $p < 0,0001$) и тахипноэ (68,4 против 25,0%, $p < 0,0001$).

При оценке уровней исследуемых интерлейкинов (IL-6 и IL-8) в сыворотке крови пациентов с ВП на момент госпитализации выявлена их зависимость от характера данной патологии — сывороточные концентрации обоих интерлейкинов были существенно выше у детей с тяжелым течением ВП по сравнению с больными с нетяжелой ВП. Так, при поступлении в стационар уровень IL-6 у детей 1-й группы оказался в 2,2 раза выше, чем у детей 2-й группы (32,8 (24,1-41,7) против 15,0 (8,5-20,0) пг/мл), $p < 0,0001$ (рис. 1). При этом концентрация IL-8 у пациентов 1-й группы в 3,6 раз превышала аналогичный показатель у больных 2-й группы (80,9 (45,6-92,7) против 22,3 (11,0-33,0) пг/мл), $p < 0,0001$ (рис. 2).

При проведении корреляционного анализа по Спирмену выявлено наличие прямых корреляционных связей средней силы между тяжестью ВП и сывороточными уровнями IL-6 ($r = 0,68$, $p < 0,0001$) и IL-8 ($r = 0,57$, $p < 0,0001$).

При анализе лабораторных критериев системного воспаления установлено, что у детей с тяжелой ВП при поступлении в стационар большинство показателей существенно превышали норму, в то время как у детей с нетяжелой ВП они были существенно ниже, а многие из них находились в пределах референсных значений. Так, у детей 1-й группы при поступлении количество лейкоцитов достигало $15,1 (9,4-18,4) \times 10^9/\text{л}$, что почти

в 2,5 раза превышало показатель детей 2-й группы — $6,3 (4,6-7,8) \times 10^9/\text{л}$ ($p = 0,002$). Та же закономерность отмечалась и со стороны абсолютного количества нейтрофилов: у пациентов 1-й группы оно было в 2 раза выше, чем у пациентов 2-й группы ($9,1 (6,6-13,3) \times 10^9/\text{л}$ и $4,3 (3,2-6,4) \times 10^9/\text{л}$ соответственно, $p = 0,004$). Концентрация РСТ в сыворотке крови пациентов 1-й группы составила 1,02 (0,78-4,70) нг/мл, более чем в 3 раза превышая уровень РСТ у больных 2-й группы — 0,31 (0,26-0,47) нг/мл ($p < 0,0001$). Уровень CRP также был в 1,7 раза выше у детей 1-й группы по сравнению с детьми 2-й группы (48 (24-96) против 28 (24-48) мг/л), однако данная разница была статистически не значима ($p = 0,904$).

Эти данные указывали на развитие системной воспалительной реакции у детей с тяжелым течением ВП, что подтверждалось выявленными корреляционными связями тяжести патологии с лейкоцитозом/нейтрофилезом ($r = 0,65/0,63$, $p < 0,001$) и концентрацией РСТ в сыворотке крови ($r = 0,75$, $p < 0,001$).

Кроме того, при проведении корреляционного анализа по Спирмену выявлено наличие достоверных корреляционных взаимосвязей изученных интерлейкинов (IL-6 и IL-8) как между собой ($r = 0,49$, $p = 0,002$), так и с другими изученными биомаркерами системного воспаления. В частности, уровень IL-6 коррелировал с лейкоцитозом ($r = 0,42$, $p = 0,009$), абсолютным количеством нейтрофилов ($r = 0,49$, $p = 0,002$) и сывороточной концентрацией РСТ ($r = 0,53$, $p < 0,001$), а уровень IL-8 — с концентрациями РСТ ($r = 0,49$, $p = 0,002$) и CRP ($r = 0,35$, $p < 0,05$). Полученные

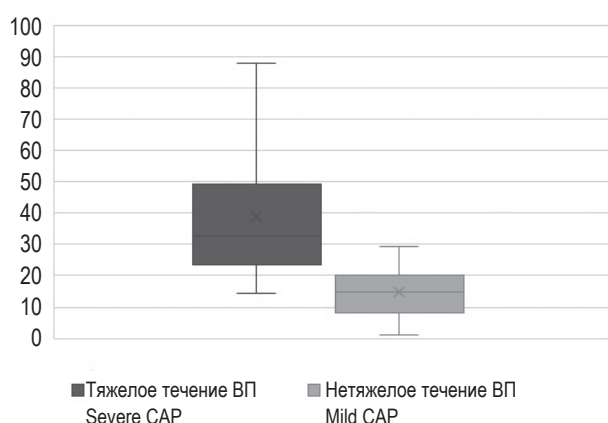


Рисунок 1. Уровень IL-6 в сыворотке крови у детей с внебольничной пневмонией

Примечание. Ось ординат — концентрация IL-6 (пг/мл).

Figure 1. The level of IL-6 in the blood serum of children with community-acquired pneumonia

Note. Ordinate axis, IL-6 concentration (pg/mL).

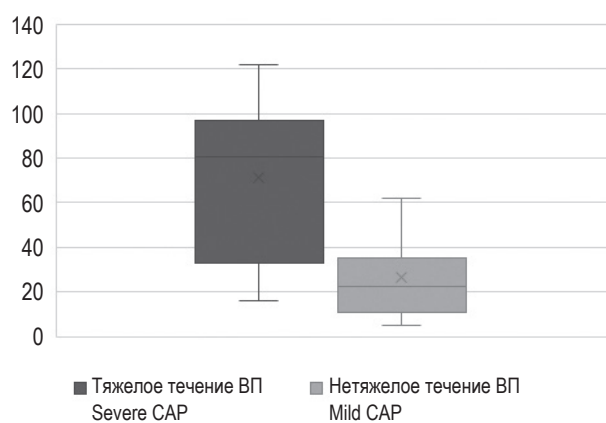


Рисунок 2. Уровни IL-8 в сыворотке крови у детей с внебольничной пневмонией

Примечание. Ось ординат — концентрация IL-8 (пг/мл).

Figure 2. The level of IL-8 in the blood serum of children with community-acquired pneumonia

Note. Ordinate axis, IL-8 concentration (pg/mL).

данные согласуются с результатами исследований ряда авторов, которые свидетельствовали об индикаторной ценности сывороточных уровней IL-6 и IL-8, отражающих тяжесть течения ВП у детей и взрослых [2, 8, 9].

Выявленные взаимосвязи указывают на вовлеченность данных интерлейкинов в развитие ВП на фоне системной воспалительной реакции, ассоциированной с данной патологией. Считается, что кратковременная экспрессия IL-6 способствует защите клеток хозяина от инфекций и повреждений тканей, стимулируя иммунный ответ острой фазы и кроветворение, а при восстановлении гомеостаза его синтез прекращается [7]. Наши данные указывают на то, что у детей с тяжелой ВП сывороточный уровень IL-6 значительно повышался, как и концентрация IL-8, который, являясь мощным хемоаттрактантом, стимулирует фагоцитарную активность иммунокомпетентных клеток [5]. Очевидно, выявленная корреляционная взаимосвязь между данными интерлейкинами указывает на их синергидное действие при развитии ВП. Полученные данные в дальнейшем могут быть использованы при разработке персонализированных алгоритмов диагностики и прогнозирования характера течения ВП у детей.

Выводы

1. Полученные результаты и их анализ свидетельствуют о том, что развитие тяжелой ВП у детей сопряжено с повышением в сыворотке крови уровней таких провоспалительных цитокинов, как IL-6 и IL-8, а также изученных лабораторных показателей системной воспалительной реакции, в том числе лейкоцитоза, концентрации РСТ и CRP.

2. Выявленные корреляционные взаимосвязи уровней изученных интерлейкинов с тяжестью ВП у детей и лабораторными индикаторами системной воспалительной реакции указывают на их патогенетическую причастность к развитию неблагоприятного течения данной патологии.

3. Выявленные изменения уровней IL-6 и IL-8 в сыворотке крови у детей с ВП позволяют рассматривать данные индикаторы в качестве перспективных биомаркеров для оценки тяжести ВП у пациентов детского возраста. Полученные данные в дальнейшем могут быть использованы при разработке персонализированных алгоритмов диагностики и прогнозирования характера течения ВП у детей.

Список литературы / References

1. Изюрова Н.В., Савочкина А.Ю., Узунова А.Н., Нохрин Д.Ю. Цитокиновый профиль при внебольничной пневмонии у детей // Медицинская иммунология, 2022. Т. 24, № 5. С. 943-954. [Iziurova N.V., Savochkina A.Yu., Uzunova A.N., Nokhrin D.Yu. Cytokine profile in community-acquired pneumonia in children. *Meditsinskaya Immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2022, Vol. 24, no. 5, pp. 943-954. doi: 10.15789/1563-0625-CPI-2538.
2. Маланичева Т.Г., Можгина С.С., Агафонова Е.В. Локальный цитокиновый профиль и цитологический статус у детей с внебольничной пневмонией, протекающей на фоне сниженной резистентности организма // Российский вестник перинатологии и педиатрии, 2017. Т. 62, № 5. С. 139-143. [Malanicheva T.G., Mozhgina S.S., Agafonova E.V. Local cytokine profile and cytological status in children with community-acquired pneumonia arising on the background of the reduced resistance of the organism. *Rossiyskiy vestnik perinatologii i pediatrii = Russian Bulletin of Perinatology and Pediatrics*, 2017, Vol. 62, no. 5, pp. 139-143. (In Russ.)]
3. О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2023 году: Государственный доклад. М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 2024. 364 с. [On the state of sanitary and epidemiological well-being of the population in the Russian Federation in 2023: State report]. Moscow: Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, 2024. 364 p.
4. Пневмония (внебольничная): клинические рекомендации. М., 2022. 56 с. [Электронный ресурс]. Режим доступа: http://disuria.ru/_ld/11/1132_kr22J12-J18MZ.pdf. [Pneumonia (community-acquired). Clinical guidelines. Moscow, 2022. 56 p. [Electronic resource]. Available at: http://disuria.ru/_ld/11/1132_kr22J12-J18MZ.pdf].
5. Симбирцев А.С. Цитокины в патогенезе и лечении заболеваний человека. СПб.: Фолиант, 2018. 512 с. [Simbirtsev A.S. Cytokines in the pathogenesis and treatment of human diseases]. St. Petersburg: Foliant, 2018. 512 p.
6. Karakioulaki M., Stolz D. Biomarkers in pneumonia – beyond procalcitonin. *Int. J. Mol. Sci.* 2019, Vol. 20, no. 8, 2004. doi: 10.3390/ijms20082004.
7. Tanaka T., Kishimoto T. The biology and medical implications of interleukin-6. *Cancer Immunol. Res.*, 2014, Vol. 2, no. 4, pp. 288-294.

8. Wang H., Zhang Y., Zhao C., Peng Y., Song W., Xu W., Wen X., Liu J., Yang H., Shi R., Zhao S. Serum IL-17A and IL-6 in paediatric Mycoplasma pneumoniae pneumonia: implications for different endotypes. *Emerg. Microbes Infect.*, 2024, Vol. 13, no. 1, 2324078. doi: 10.1080/22221751.2024.2324078.
9. Weidhase L., Wellhöfer D., Schulze G., Kaiser T., Drogies T., Wurst U., Petros S. Is interleukin-6 a better predictor of successful antibiotic therapy than procalcitonin and C-reactive protein? A single center study in critically ill adults. *BMC Infect Dis.*, 2019, Vol. 19, 150. doi: 10.1186/s12879-019-3800-2.
10. Yao G., Ma C., Liu J., Sun Z., Wei B. Interleukin-6 serum levels are independently associated with severe adenovirus pneumonia in children: a cross-sectional study. *Transl. Pediatr.*, 2022, Vol. 11, no. 12, pp. 1962-1971.

Авторы:

Аникеева Н.А. — к.м.н., доцент кафедры факультетской и поликлинической педиатрии ФГБОУ ВО «Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, г. Рязань, Россия

Жулева А.Ю. — ассистент кафедры факультетской и поликлинической педиатрии ФГБОУ ВО «Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, г. Рязань, Россия

Белых Н.А. — д.м.н., заведующая кафедрой поликлинической педиатрии ФГБОУ ВО «Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, г. Рязань, Россия

Абаленихина Ю.В. — д.м.н., профессор кафедры биологической химии, ведущий научный сотрудник лаборатории изучения фармакокинетики лекарственных веществ центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО «Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, г. Рязань, Россия

Паринская Е.С. — заведующая клинико-диагностической лабораторией ГБУ РО «Городская клиническая больница № 11», г. Рязань, Россия

Authors:

Anikeeva N.A., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Faculty and Polyclinic Pediatrics, Ryazan State Medical University, Ryazan, Russian Federation

Zhuleva A.Yu., Assistant Professor, Department of Faculty and Polyclinic Pediatrics, Ryazan State Medical University, Ryazan, Russian Federation

Belykh N.A., PhD, MD (Medicine), Head, Department of Polyclinic Pediatrics, Ryazan State Medical University, Ryazan, Russian Federation

Abalenikhina Yu.V., PhD, MD (Medicine), Professor of the Department of Biological Chemistry, Leading Researcher of the Laboratory for the Study of Pharmacokinetics of Medicinal Substances, Central Research Laboratory, Ryazan State Medical University, Ryazan, Russian Federation

Parinskaya E.S., Head, Clinical Diagnostic Laboratory, City Clinical Hospital No. 11, Ryazan, Russian Federation

Поступила 30.03.2025
Отправлена на доработку 08.04.2025
Принята к печати 25.05.2025

Received 30.03.2025
Revision received 08.04.2025
Accepted 25.05.2025

ВЛИЯНИЕ МЕЖДУНАРОДНЫХ ПОЕЗДОК НА СЕРОРАСПРОСТРАНЕННОСТЬ SARS-CoV-2 СРЕДИ ЖИТЕЛЕЙ ГОРОДА ЧЕЛЯБИНСКА

Крицкий И.С.¹, Зурочка А.В.², Зурочка В.А.², Сарапульцев А.П.^{1,3}

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

² ФБУН «Федеральный научно-исследовательский институт вирусных инфекций “Виром”» Роспотребнадзора,
г. Екатеринбург, Россия

³ ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный университет», г. Челябинск, Россия

Резюме. Серораспространенность SARS-CoV-2 является важным индикатором распространения коронавирусной инфекции, особенно среди групп населения с различным уровнем мобильности. Международные поездки могут способствовать переносу вируса и влиять на уровень коллективного иммунитета, однако степень этого влияния остается изученной недостаточно. В рамках данного исследования, проводившегося в Челябинске с 27.10.2020 по 30.01.2023, был выполнен анализ 660 проб на антитела IgM и 843 проб на антитела IgG с целью оценки серопозитивности жителей города в зависимости от наличия недавнего опыта международных поездок. Антитела к коронавирусной инфекции определялись методом иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием оборудования Multiskan FC и реагентов АО «Вектор-Бест», а анкетирование участников исследования помогло установить факт поездок и страны посещения. Результаты исследования показали тенденцию к более высокой серопозитивности IgG среди лиц, совершивших международные поездки ($p = 0,07$), хотя статистическая значимость не была достигнута. Общий уровень серопозитивности был выше для IgG (67,38%) по сравнению с IgM (32,73%), что может указывать на перенесенную инфекцию или вакцинацию в прошлом в выборке. Наибольшая серопозитивность IgG наблюдалась среди вернувшихся из Турции, Казахстана и Египта. Статистически значимых различий в серораспространенности между мужчинами и женщинами не обнаружено. Полученные результаты указывают на тенденцию к более высокой серопозитивности среди путешественников, что может свидетельствовать о повышенном риске инфицирования во время поездок. Однако отсутствие статистической значимости требует дальнейших исследований на более крупных выборках, а также с учетом вакцинационного статуса, динамики сероконверсии, временного профиля заболевания и повторных тестирований. Несмотря на указанные ограничения, данные исследования могут быть использованы для совершенствования мер эпидемиологического контроля и планирования мероприятий по профилактике COVID-19 и других респираторных инфекциях, в том числе и в условиях международного туризма.

Ключевые слова: антитела, иммунитет, иммуноферментный анализ, серопозитивность, SARS-CoV-2, COVID-19

Адрес для переписки:

Крицкий Игорь Сергеевич
ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии»
Уральского отделения Российской академии наук
620049, Россия, г. Екатеринбург,
ул. Первомайская, 106.
Тел.: 8 (950) 658-74-62.
E-mail: igor81218@gmail.com

Address for correspondence:

Igor S. Kritsky
Institute of Immunology and Physiology,
Ural Branch, Russian Academy of Sciences
106 Pervomayskaya St
Ekaterinburg
620049 Russian Federation
Phone: +7 (950) 658-74-62.
E-mail: igor81218@gmail.com

Образец цитирования:

И.С. Крицкий, А.В. Зурочка, В.А. Зурочка,
А.П. Сарапульцев «Влияние международных
поездок на серораспространенность SARS-CoV-2
среди жителей города Челябинска» // Российский
иммунологический журнал, 2025. Т. 28, № 3. С. 687-694.
doi: 10.46235/1028-7221-17216-IOI

© Крицкий И.С. и соавт., 2025

Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

I.S. Kritsky, A.V. Zurochka, V.A. Zurochka, A.P. Sarapultsev
“Impact of international travels on seroprevalence of SARS-
CoV-2 among residents of Chelyabinsk city”, Russian Journal
of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2025,
Vol. 28, no. 3, pp. 687-694.
doi: 10.46235/1028-7221-17216-IOI

© Kritsky I.S. et al., 2025

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

DOI: 10.46235/1028-7221-17216-IOI

IMPACT OF INTERNATIONAL TRAVELS ON SEROPREVALENCE OF SARS-CoV-2 AMONG RESIDENTS OF CHELYABINSK CITY

Kritsky I.S.^a, Zurochka A.V.^b, Zurochka V.A.^b, Sarapultsev A.P.^{b, c}

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

^b Federal Research Institute of Viral Infections "Virom", Ekaterinburg, Russian Federation

^c South Ural State University, Chelyabinsk, Russian Federation

Abstract. SARS-CoV-2 seroprevalence is an important index of coronavirus infection incidence, especially among populations with different mobility levels. International travel may facilitate transmission of the virus and affect the level of herd immunity, but the extent of this influence remains poorly understood. The present study was conducted in Chelyabinsk from 27.10.2020 to 30.01.2023. 660 blood samples were analyzed for IgM antibodies, and 843 samples for IgG antibodies to SARS-CoV-2 antigen in order to assess seropositivity rates of city residents depending on their recent international travel experience. Antibodies to coronavirus infection were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using Multiskan FC equipment and Vector-Best reagents. A questionnaire filled by the participants helped to establish the fact of travel and the countries visited. The results of this study showed a trend towards higher IgG seropositivity among individuals who had traveled internationally ($p = 0.07$), although statistical significance was not reached. The overall seroprevalence rate was higher for IgG (67.38%) compared to IgM (32.73%), thus, probably, suggesting a history of infection or vaccination in the cohort. The highest IgG seroprevalence was observed among persons who returned from Turkey, Kazakhstan, and Egypt. No statistically significant differences in seroprevalence were found between men and women. The results suggest a trend towards higher seroprevalence among the international travelers, thus being indicative for increased risk of infection during the trips. However, a lack of statistical significance requires further surveys in larger groups, as well as considering their vaccination status, seroconversion dynamics, disease time profile, and repeated testing. Despite these limitations, these results can be used to improve epidemiological surveillance measures and planning epidemiological measures in order to prevent COVID-19 and other respiratory infections, including the factor of international travelling.

Keywords: antibodies, immunity, immunoenzyme analysis, seropositivity, SARS-CoV-2, COVID-19

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

Работа выполнена по теме гос. заданий НИИ-ВИ «ВИРОМ» «Изучение механизмов формирования хронической вирусной инфекции у пациентов с постковидным синдромом и нарушением функций иммунной системы. Разработка патогенетических подходов к эффективной профилактике и иммунокоррекции выявленных нарушений у пациентов с «постковидным синдромом», № гос. регистрации 124031800093-5.

Введение

Международные поездки являются значительным фактором риска для распространения инфекционных заболеваний, включая COVID-19. В условиях глобализации и высокой мобильности населения патогены могут быстро переме-

щаться, что усложняет контроль за эпидемиологической ситуацией. Еще в первый год пандемии COVID-19 было установлено, что регионы с высоким уровнем международного туризма сталкивались с большим числом случаев заболеваний и смертей, связанных с вспышкой SARS-CoV-2 [5]. Для борьбы с распространением инфекции многие страны вводили ограничительные меры для путешественников, такие как частичное закрытие границ, обязательный карантин и скрининг прибывающих в страну [2, 12]. Несмотря на то что ограничения на международные поездки в Китае помогли замедлить распространение вируса в другие регионы [4], полностью остановить эпидемию COVID-19 не удалось [10], в том числе из-за высокой доли бессимптомных случаев заражения [11].

Сероконверсия, или появление специфических антител, является важным индикатором иммунного ответа на инфекцию, включая COVID-19. Серологические методы исследования (определение специфических антител) позволяют выяв-

лать пропущенные случаи COVID-19, особенно у лиц, которые обратились за медицинской помощью поздно, после начала симптомов, что помогает лучше понять масштабы распространения инфекции. Кроме того, серология может быть использована для установления эпидемиологических связей, выявляя скрытые (бессимптомные) случаи и помогая в определении времени заражения, что особенно важно для ретроспективной диагностики [6].

Серологические методы в сочетании с тестированием на нуклеиновые кислоты коронавируса могут быть полезны для усиления скрининга путешественников. Было установлено, что добавление теста на антитела IgM среди прибывающих в места, где новые случаи COVID-19 редки и требуют более тщательного мониторинга, может повысить общую чувствительность выявления острых и недавних случаев COVID-19 [2].

С течением пандемии коронавирусной инфекции многие страны начали ослаблять ограничения на международные поездки, пытаясь стимулировать свою экономику. Однако для сдерживания распространения COVID-19 была выдвинута концепция иммунных паспортов, в соответствии с которой серологическое доказательство выработки антител к SARS-CoV-2 указывает на потенциальный иммунитет к повторной инфекции. Несмотря на то что концепция иммунных паспортов имела свои риски и требовала более детального изучения, в качестве основы для нее предлагалось использовать определение уровня IgG и IgM к коронавирусу [3].

Таким образом, серологические методы исследования могут быть применены для оценки эпидемиологических особенностей распространения SARS-CoV-2, обусловленных международными поездками во время пандемии COVID-19, а также для получения дополнительных данных о формировании иммунитета у путешественников.

Особенно актуальной становится задача определения возможной связи между фактом недавней международной поездки и наличием антител к SARS-CoV-2 у жителей конкретного региона. Такие данные позволяют глубже понять локальные эпидемиологические особенности и оценить роль трансграничных перемещений в поддержании циркуляции вируса.

В связи с этим проведено исследование, направленное на изучение уровня серопозитивности среди различных категорий населения, различающихся по эпидемиологически значимому критерию — наличию или отсутствию международных поездок.

Цель исследования — оценить серопозитивность COVID-19 на основе антител IgG и IgM к SARS-CoV-2 среди двух групп населения города

Челябинска: международных путешественников, вернувшихся из-за границы, и местных жителей, не покидавших регион в последние 14 дней.

Материалы и методы

Сбор данных для исследования осуществлялся в период с 27.10.2020 по 30.01.2023 среди жителей города Челябинска. Серопозитивность определялась путем тестирования на антитела IgG и/или IgM к SARS-CoV-2 с использованием метода «непрямого» двухэтапного иммуноферментного анализа (ИФА). Оборудование для проведения ИФА было представлено анализатором Multiskan FC с фильтрами 405 нм, 450 нм, 620 нм (Thermo Scientific, США), реагентами D-5501 SARS-CoV-2-IgG-ИФА-BEST, D-5502 SARS-CoV-2-IgM-ИФА-BEST (АО «Вектор-Бест», г. Новосибирск, Россия), планшетами с иммобилизованным рекомбинантным антигеном SARS-CoV-2 (RBD белок S), автоматическими пипетками, набором для забора венозной крови, пробирками, содержащими распыленный силикагель и полимерный гель для разделения сыворотки, центрифугой.

Перед анализом проводилась подготовка образцов: кровь забиралась методом венепункции в пробирки с силикагелем и полимерным гелем, а затем центрифугировалась (1500 g, 20 мин). Далее 10 мкл получившейся сыворотки разводились до 100 мкл, вносились в лунки планшета с иммобилизованным антигеном SARS-CoV-2 и инкубировались 30 минут при 37 °C. Затем добавлялся раствор конъюгата с моноклональными антителами, тетраметилбензидин, и итоговые образцы выдерживались 25 минут при комнатной температуре. Реакция останавливалась стоп-реагентом, после чего оптическая плотность измерялась при 450 нм.

Результат рассчитывался с помощью коэффициента позитивности (КП) по формуле:

$$\text{КП} = \frac{\text{Оптическая плотность образца}}{\text{Оптическая плотность критическая}}$$

При $\text{КП} \geq 1,1$ анализ считался положительным, при $\text{КП} < 0,8$ — отрицательным, а в диапазоне 0,8–1,1 — сомнительным.

До начала проведения ИФА участников исследования попросили заполнить анкету, в которой они должны были сообщить о наличии международных поездок за последние 14 дней и указать страны, которые они посетили.

Сбор, консолидация и хранение результатов исследования осуществлялись в СУБД PostgreSQL 14.17. Дальнейшая обработка и анализ были выполнены с помощью R 3.1.1 12 (R Foundation for Statistical Computing, Вена, Австрия).

Этическое одобрение

Исследование было одобрено:

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

2. Независимым локальным этическим комитетом при ФНИИВИ «Виром» Роспотребнадзора г. Екатеринбурга, протокол № 1 от 22.03.2024, на базе которого проводились данные исследования.

3. Независимым локальным этическим комитетом при ООО «ДокторЛаб» г. Челябинска (протокол № 3 от 10.11.2020), на базе которого проводились данные исследования.

Результаты и обсуждение

В ходе исследования за весь период было выполнено 660 иммуноферментных анализов на определение IgM к SARS-CoV-2 и 843 на определение IgG. Из них 386 (58,48%) анализов к IgM и 463 (54,92%) анализа к IgG были выполнены для мужчин. Средний возраст участников исследования, прошедших тестирование на IgM, составил $41,58 \pm 12,45$ года, а для тестирования на IgG — $41,86 \pm 12,23$ года. Среди выполненных ИФА на определение IgM в 47 случаях (7,12%) анализы проводились у лиц, совершавших международные поездки в последние 14 дней. Для ИФА на IgG этот показатель составил 83 случая (9,85%). География международных поездок была разнообразной и охватывала 21 страну и разные континенты. В 8 анкетах, приложенных к ИФА на IgM, и 9 анкетах, сопровождающих ИФА на IgG, участники указали факт международной поездки, но не уточнили регион.

Среди выполненных ИФА на IgM положительный результат был получен в 216 случаях (32,73%), сомнительный — в 32 (4,85%), а отрицательный — в 412 (62,42%). Для ИФА на IgG положительный результат наблюдался в 568 случаях (67,38%), сомнительный — в 6 (0,71%), а отрицательный — в 269 (31,91%).

Распределение результатов ИФА на IgM по полу показало, что среди анализов, проведенных для женщин, 170 (62,04%) были отрицательными, 14 (5,11%) — сомнительными и 90 (32,85%) — положительными. Среди анализов на IgM, проведенных для мужчин, 242 (62,69%) были отрицательными, 18 (4,66%) — сомнительными и 126 (32,64%) — положительными.

Среди ИФА на IgG, проведенных для женщин, 128 (33,68%) были отрицательными, 5 (1,32%) — сомнительными и 247 (65,00%) — положительными. Среди анализов на IgG, проведенных для мужчин, 141 (30,45%) был отрицательным,

1 (0,22%) — сомнительным и 321 (69,33%) — положительным.

Для оценки статистической значимости различий между полами был проведен тест Хи-квадрат Пирсона. Результаты показали, что для IgM различия между полами не являются статистически значимыми ($\chi^2 = 0,08$, $p\text{-value} = 0,96$). Для IgG наблюдается тенденция к различиям, однако результаты также не достигли статистической значимости на уровне $p = 0,05$ ($\chi^2 = 4,81$, $p\text{-value} = 0,09$).

Средний возраст участников с положительными результатами на IgM к SARS-CoV-2 составил $41,87 \pm 11,91$ года, с сомнительными — $42,16 \pm 12,90$ года, а с отрицательными — $41,38 \pm 12,71$ года. Для IgG средний возраст составил $41,60 \pm 12,08$ года у серопозитивных участников, $36,67 \pm 15,24$ года у сомнительных и $42,54 \pm 12,48$ года у серонегативных.

Для оценки статистической значимости различий в возрасте между серопозитивными и серонегативными участниками был проведен критерий Вилкоксона, так как тест Шапиро—Уилка показал отсутствие нормальности распределения ($p\text{-value} < 0,05$). Для IgM не было выявлено статистически значимых различий в возрасте между положительными и отрицательными анализами ($W = 46536$, $p\text{-value} = 0,34$). Аналогично, сравнение возрастных характеристик среди участников с положительными и отрицательными результатами на IgG не выявило значимых различий ($W = 75988$, $p\text{-value} = 0,9$).

Среди ИФА на IgM у лиц, не совершавших международные поездки перед сдачей анализа, 204 из 613 (33,28%) были положительными, 31 (5,06%) — сомнительным, а 378 (61,66%) — отрицательными. У лиц, вернувшихся из международных поездок, положительный результат был получен в 12 из 47 (25,53%) случаев, сомнительный — в 1 (2,13%), а отрицательный — в 34 (72,34%). Статистический анализ с использованием критерия Хи-квадрат Пирсона показал отсутствие значимой разницы между группами ($\chi^2 = 2,37$, $p = 0,31$).

Для IgG среди лиц, не совершавших международные поездки перед сдачей анализа, положительный результат выявлен в 503 из 760 (66,18%) случаев, сомнительный — в 6 (0,79%), а отрицательный — в 251 (33,03%). У путешественников положительные результаты встречались в 65 из 83 (78,31%) случаев, в то время как отрицательные — в 18 (21,69%). Различие между группами по частоте выявления антител IgG оказалось на грани статистической значимости ($\chi^2 = 5,30$, $p = 0,07$).

Среди лиц, совершавших международные поездки и прошедших тестирование на IgG, наибольшее количество положительных результатов

было зарегистрировано у вернувшихся из Турции (87,10%), Казахстана (87,50%) и Египта (66,67%). Также 100% положительных случаев выявлено среди тех, кто посетил ОАЭ, Кипр, Узбекистан, Италию и Доминиканскую Республику, однако количество анализов в этих группах было небольшим. В случае с IgM также наибольшее число положительных результатов отмечалось среди путешественников, прибывших из Турции (33,33%), Казахстана (33,33%) и Мальдив (33,33%), хотя в целом доля положительных тестов на IgM среди путешественников была ниже, чем на IgG. Наибольшее число отрицательных результатов зарегистрировано у вернувшихся из Армении, Германии и США. Подробное распределение полученных результатов ИФА на антитела к SARS-CoV-2 по странам представлено на рисунках 1 и 2.

Полученные результаты демонстрируют особенности серопревалентности SARS-CoV-2 среди населения Челябинска в контексте международных поездок.

Анализ влияния факта международных поездок на серопревалентность SARS-CoV-2 выявил тенденцию к более высокой серопревалентности IgG среди лиц, совершивших международные поездки. Это может свидетельствовать о большей

вероятности контакта с вирусом во время зарубежных поездок. Анализ данных по странам назначения выявил особенно высокие показатели серопревалентности IgG среди вернувшихся из Турции, Казахстана и Египта. Такое распределение сероположительных результатов можно объяснить большой популярностью этих стран для туристов из Челябинска. Однако следует учитывать возможное влияние эффекта малых чисел для некоторых направлений.

Также среди людей, совершавших международные поездки, отмечалась более высокая доля серопозитивных анализов по IgG к коронавирусной инфекции (67,38%) по сравнению с серопозитивностью по IgM (32,73%), что указывает на преобладание среди обследованных лиц тех, кто перенес COVID-19 относительно давно или был вакцинирован от SARS-CoV-2 [7]. В данном ключе необходимо подчеркнуть, что на 2021 год серораспространенность по IgG в Уральском федеральном округе составляла лишь 18,5% [8].

Несмотря на тенденцию к более высокой серопозитивности среди путешественников, статистическая значимость для IgG не была достигнута ($p = 0,07$), а для IgM различия между группами отсутствуют ($p = 0,31$). Это указывает на необходимость осторожной интерпретации полученных

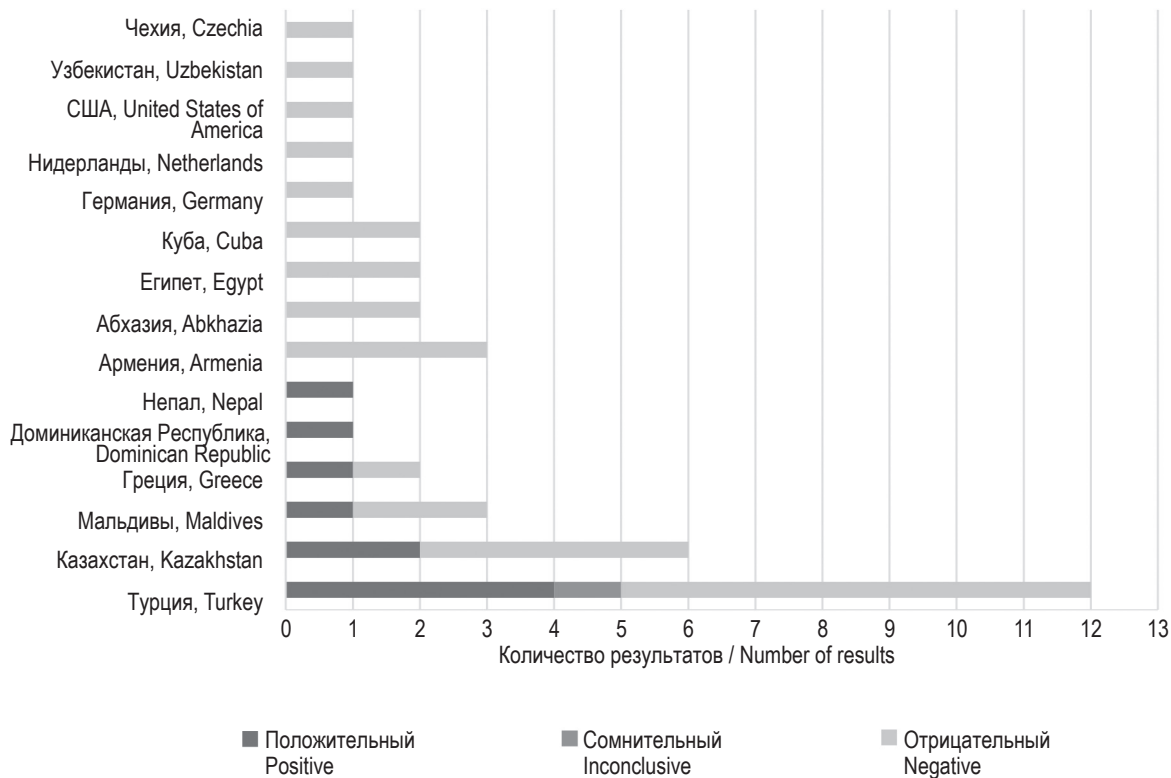


Рисунок 1. Распределение результатов ELISA IgM к SARS-CoV-2 по странам международных поездок

Figure 1. Distribution of ELISA IgM results to SARS-CoV-2 by countries of international travel

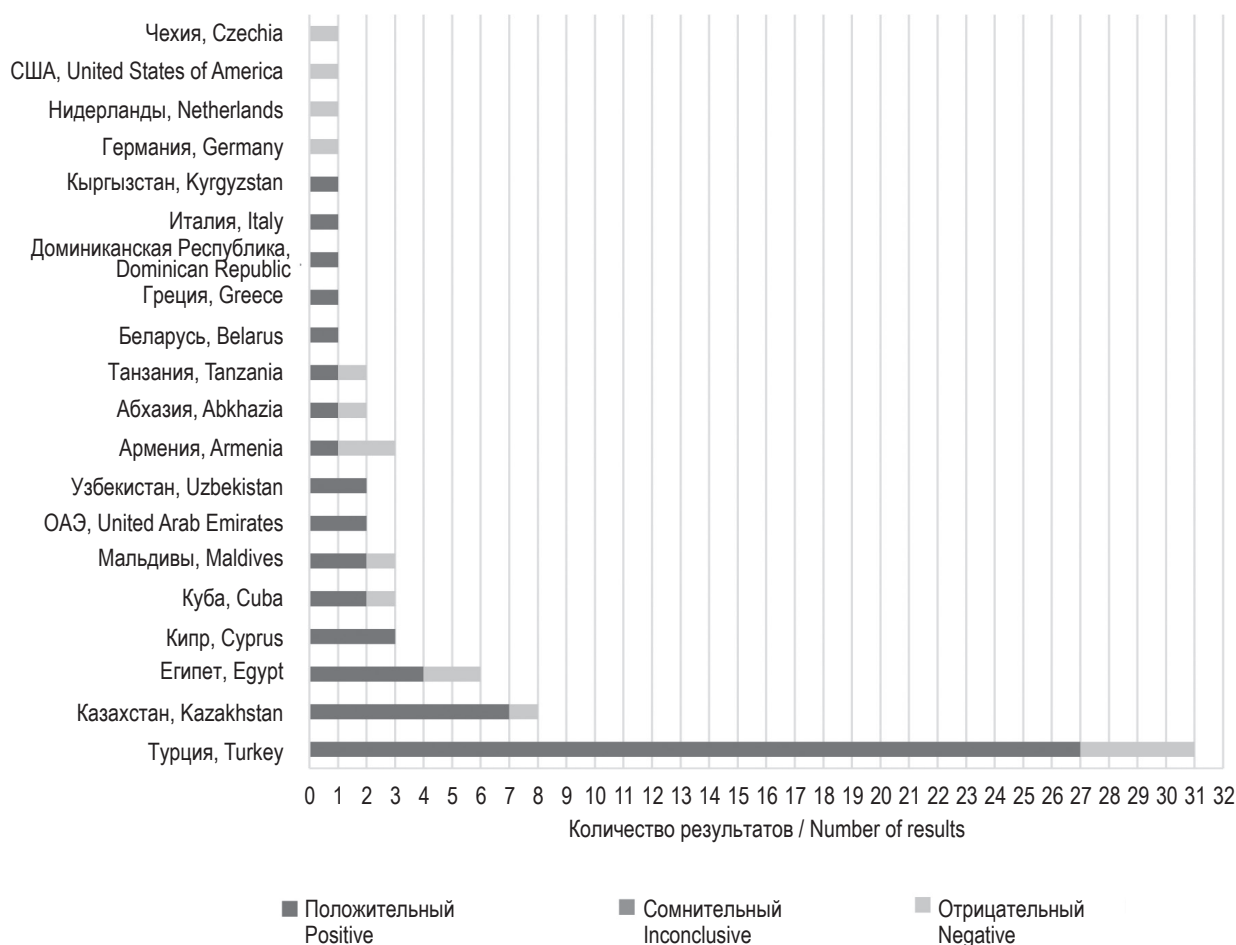


Рисунок 2. Распределение результатов ELISA IgG к SARS-CoV-2 по странам международных поездок

Figure 2. Distribution of ELISA IgG results to SARS-CoV-2 by countries of international travel

данных и проведения более масштабных исследований для подтверждения выявленных трендов.

Кроме того, в работе не обсуждается возможное влияние вакцинационного статуса участников, хотя известно, что вакцинация существенно влияет на уровень IgG. Отсутствие этой информации в анкетах может быть существенным ограничением при интерпретации результатов.

Также следует учесть временные рамки исследования (с 2020 по 2023 год), в течение которых происходили существенные изменения в эпидемиологической обстановке, охвате вакцинацией и циркулирующих вариантах SARS-CoV-2. Это может объяснить разную серологическую картину в начале и конце периода, однако анализ по временным кластерам в статье не проведен.

Сомнительные результаты (в диапазоне КП 0,8-1,1), хотя и представлены количественно, не подвергались отдельному анализу. Между тем такие значения могут указывать как на ранние стадии сероконверсии, так и на кросс-реакции или

пограничные уровни антител после вакцинации, что требует дополнительного внимания.

Статистически значимые различия в серопревалентности между мужчинами и женщинами не были найдены. При этом литературные данные по данному вопросу достаточно противоречивы [8, 9], хотя большинство все же отмечает более высокие показатели серопозитивности у женщин в связи с более выраженным иммунным ответом на инфекцию и/или вакцинацию [1]. Ограничения данного исследования включают потенциальную недооценку серопревалентности из-за временного характера антительного ответа на SARS-CoV-2 и возможного влияния вакцинации на результаты тестирования.

Таким образом, хотя заявленная цель исследования была формально достигнута, интерпретация полученных результатов требует осторожности. Для более точной оценки влияния международных поездок на серопревалентность необходимы более крупные выборки, учет вакцинационного статуса, временного профиля за-

болевания и повторных тестирований. В целом же полученные данные могут быть использованы для совершенствования мер эпидемиологического контроля и планирования мероприятий по профилактике COVID-19 и других респираторных инфекциях, в том числе и в условиях международного туризма.

Выводы

1. Лица, вернувшиеся из зарубежных стран, показали более высокую серопозитивность по IgG к SARS-CoV-2 на уровне статистической тенденции (p -value < 0,1), что может свидетельствовать о большем контакте с вирусом во время поездок.

2. Более высокие показатели серопозитивности по IgG (67,38%) к коронавирусу по сравнению с IgM (32,73%) в выборке могут указывать на то, что большинство обследованных либо пе-

ренесли COVID-19 ранее, либо были вакцинированы.

3. Высокие уровни серопозитивности IgG к коронавирусной инфекции были зафиксированы среди возвращавшихся из Турции, Казахстана и Египта. Однако в ряде направлений (например, ОАЭ, Узбекистан, Кипр) положительные результаты выявлены при очень малом числе наблюдений, что требует осторожности при обобщении.

4. Результаты исследования подчеркивают возможность использования серологических методов для ретроспективной оценки эпидемиологической ситуации и подтверждают значимость учета международных поездок при интерпретации серопревалентности SARS-CoV-2. В будущем подобные данные могут быть использованы для совершенствования алгоритмов скрининга и предикции эпидемиологических рисков, особенно в условиях высокой мобильности населения.

Список литературы / References

1. Крицкий И.С., Зурочка В.А., Hu D., Сарапульцев А.П. Оценка динамики изменения серопревалентности COVID-19 в различных социальных группах в период пандемии SARS-CoV-2 // Вестник Уральской медицинской академической науки, 2022. Т. 19, № 3. С. 304-314. [Kritsky I.S., Zurochka V.A., Hu D., Sarapultsev A.P. Evaluation of the dynamics of changes in COVID-19 seroprevalence in various social groups during the SARS-CoV-2 pandemic. *Vestnik Uralskoy meditsinskoy akademicheskoy nauki = Journal of Ural Medical Academic Science*, 2022. Vol. 19, no. 3, pp. 304-314. (In Russ.)]
2. Bou-Karroum L., Khabsa J., Jabbour M., Hilal N., Haidar Z., Abi Khalil P., Abdul Khalek R., Assaf J., Honein-AbouHaidar G., Abou Samra C., Hneiny L., Al-Awlaqi S., Hanefeld J., El-Jardali F., Akl E.A., El Bcheraoui C. Public health effects of travel-related policies on the COVID-19 pandemic: A mixed-methods systematic review. *J. Infect.*, 2021, Vol. 83, no. 4, pp. 413-423.
3. Chen L.H., Freedman D.O., Visser L.G. COVID-19 immunity passport to ease travel restrictions? *J. Travel Med.*, 2020, Vol. 27, no. 5, taaa085. doi: 10.1093/jtm/taaa085.
4. Chinazzi M., Davis J.T., Ajelli M., Gioannini C., Litvinova M., Merler S., Pastore Y Piontti A., Mu K., Rossi L., Sun K., Viboud C., Xiong X., Yu H., Halloran M.E., Longini Jr. I.M., Vespignani A. The effect of travel restrictions on the spread of the 2019 novel coronavirus (COVID-19) outbreak. *Science*, 2020, Vol. 368, no. 6489, pp. 395-400.
5. Farzanegan M.R., Gholipour H.F., Feizi M., Nunkoo R., Andargoli A.E. International tourism and outbreak of coronavirus (COVID-19): a cross-country analysis. *J. Travel Res.*, 2021, Vol. 60, no. 3, pp. 687-692.
6. Hasan T., Lim H.L., Case J., Hueston L., Bag S., Dwyer D.E., O'Sullivan M.V. The utility of SARS-CoV-2-specific serology in COVID-19 diagnosis. *Aust. N. Z. J. Public Health*, 2021, Vol. 45, no. 6, pp. 616-621.
7. Hou H., Wang T., Zhang B., Luo Y., Mao L., Wang F., Wu S., Sun Z. Detection of IgM and IgG antibodies in patients with coronavirus disease 2019. *Clin. Transl. Immunol.*, 2020, Vol. 9, no. 5, e1136. doi: 10.1002/cti2.1136.
8. Popova A.Y., Smirnov V.S., Andreeva E.E., Babura E.A., Balakhonov S.V., Bashketova N.S., Bugorkova S.A., Bulanov M.V., Valeullina N.N., Vetrov V.V., Goryaev D.V., Detkovskaya T.N., Ezhlova E.B., Zaitseva N.N., Istorik O.A., Kovalchuk I.V., Kozlovskikh D.N., Kombarova S.Y., Kurganova O.P., Lomovtsev A.E., Lukicheva L.A., Lyalina L.V., Melnikova A.A., Mikailova O.M., Noskov A.K., Noskova L.N., Oglezneva E.E., Osmolovskaya T.P., Patyashina M.A., Penkovskaya N.A., Samoilova L.V., Stepanova T.F., Trotsenko O.E., Totolian A.A. SARS-CoV-2 seroprevalence structure of the Russian population during the COVID-19 pandemic. *Viruses*, 2021, Vol. 13, no. 8, 1648. doi: 10.3390/v13081648.
9. Sarapultseva M., Hu D., Sarapultsev A. SARS-CoV-2 Seropositivity among dental staff and the role of aspirating systems. *JDR Clin. Transl. Res.*, 2021, Vol. 6, no. 2, pp. 132-138.
10. Wells C.R., Sah P., Moghadas S.M., Pandey A., Shoukat A., Wang Y., Wang Z., Meyers L.A., Singer B.H., Galvani A.P. Impact of international travel and border control measures on the global spread of the novel 2019 coronavirus outbreak. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2020, Vol. 117, no. 13, pp. 7504-7509.

11. Wong J., Abdul Aziz A.B.Z., Chaw L., Mahamud A., Griffith M.M., Lo Y.R., Naing L. High proportion of asymptomatic and presymptomatic COVID-19 infections in air passengers to Brunei. *J. Travel Med.*, 2020, Vol. 27, no. 5 taaa066. doi: 10.1093/jtm/taaa066.
12. Zurochka A., Dobrinina M., Zurochka V., Hu D., Solovyev A., Ryabova L., Kritsky I., Ibragimov R., Sarapultsev A. Seroprevalence of SARS-CoV-2 antibodies in symptomatic individuals is higher than in persons who are at increased risk exposure: the results of the single-center, prospective, cross-sectional study. *Vaccines*, 2021, Vol. 9, no. 6, 627. doi: 10.3390/vaccines9060627.

Авторы:

Крицкий И.С. — аспирант ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук, г. Екатеринбург, Россия

Зурочка А.В. — д.м.н., заслуженный деятель науки РФ, ведущий научный сотрудник лаборатории трансмиссивных вирусных инфекций ФБУН «Федеральный научно-исследовательский институт вирусных инфекций “Вирум”» Роспотребнадзора, г. Екатеринбург, Россия

Зурочка В.А. — д.м.н., старший научный сотрудник лаборатории трансмиссивных вирусных инфекций ФБУН «Федеральный научно-исследовательский институт вирусных инфекций “Вирум”» Роспотребнадзора, г. Екатеринбург, Россия

Сарапультцев А.П. — д.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории иммунопатофизиологии ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук, г. Екатеринбург; директор Научно-образовательного Российско-китайский центр системной патологии ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный университет», г. Челябинск, Россия

Authors:

Kritsky I.S., Postgraduate Student, Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, Russian Federation

Zurochka A.V., PhD, MD (Medicine), Honored Scientist of the Russian Federation, Leading Researcher, Laboratory of Transmissible Viral Infections, Federal Research Institute of Viral Infections “Virom”, Ekaterinburg, Russian Federation

Zurochka V.A., PhD, MD (Medicine), Senior Researcher, Laboratory of Transmissible Viral Infections, Federal Research Institute of Viral Infections “Virom”, Ekaterinburg, Russian Federation

Sarapultsev A.P., PhD, MD (Biology), Leading Researcher, Laboratory of Immunopathophysiology, Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg; Director, Russian-Chinese Center of Systemic Pathology, South Ural State University, Chelyabinsk, Russian Federation

Поступила 01.04.2025
Отправлена на доработку 15.04.2025
Принята к печати 25.05.2025

Received 01.04.2025
Revision received 15.04.2025
Accepted 25.05.2025

ОСОБЕННОСТИ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ИММУННОГО ОТВЕТА У ПАЦИЕНТОВ С ПОСТКОВИДНЫМ СИНДРОМОМ И НАЛИЧИЕМ В АНАМНЕЗЕ ВИРУСА ГЕРПЕСА 6-ГО ТИПА (HHV-6)

Верховская М.Д.¹, Марченко В.С.²

¹ ФБУН «Федеральный научно-исследовательский институт вирусных инфекций “Виром”» Роспотребнадзора, г. Екатеринбург, Россия

² ФГБОУ ВО «Челябинский государственный университет», г. Челябинск, Россия

Резюме. С конца 2019 года люди столкнулись с коронавирусной инфекцией, которая представляет собой заболевание, вызванное новым штаммом коронавируса — SARS-CoV-2. Данное заболевание привело к одной из глобальных проблем человечества — пандемии. Несмотря на то, что клинические проявления COVID-19 со временем приобрели черты, характерные для сезонных вирусных инфекций, были выявлены стойкие нарушения в функционировании различных систем организма. Было установлено, что после перенесенного COVID-19 у значительного числа пациентов наблюдаются многочисленные ухудшения как общего состояния здоровья, так и выявлены осложнения уже имеющихся хронических заболеваний, в том числе герпесвирусной инфекции и папилломавирусной инфекции. В связи с этим перед научным сообществом возникла дополнительная задача — всестороннее и углубленное изучение постковидного синдрома для выявления способов улучшения состояния пациентов. В настоящее время выявлено, что около 90% населения планеты инфицировано герпесвирусами. В некоторых случаях у одного человека может быть выявлено наличие нескольких типов герпесвирусов, что называется коинфекцией. Герпесвирусная инфекция может проявляться от локального лабиального герпеса до генерализованных форм, злокачественных новообразований и врожденных аномалий развития. Она может протекать как в острой, так и в латентной форме. Исследование герпесвирусной инфекции в контексте постковидного синдрома представляет собой одну из наиболее актуальных проблем современной медицины. Целью данного исследования являлось изучение особенностей изменений показателей иммунного ответа у пациентов с постковидным синдромом и с лабораторно и клинически подтвержденным вирусом герпеса 6-го типа и для этого были предоставлены изменения показателей врожденного иммунного ответа такие как система комплемента, фагоцитарная активность нейтрофилов. Для исследования применялись клинические, иммунологические (иммунноферментный анализ и НСТ-тест (нитросиний тетразолий)) и статистические методы анализа (критерий Манна–Уитни). Были тщательно изучены и проанализированы данные, свидетельствующие о том, что побочные реакции, вызванные перенесенной коронавирусной инфекцией, характеризуются новыми аспектами, проявляющимися в нарушениях функционирования систем приобретенного и врожденного иммунитета, что приводит к более серьезным последствиям

Адрес для переписки:

Верховская Мария Дмитриевна
ФБУН «Федеральный научно-исследовательский
институт вирусных инфекций “Виром”»
Роспотребнадзора
620030, Россия, г. Екатеринбург, ул. Летняя, 23.
Тел.: 8 (912) 511-69-43.
E-mail: maria.verh1@mail.ru

Address for correspondence:

Maria D. Verkhovskaya
Federal Research Institute of Viral Infections “Virom”
23 Letnya St
Ekaterinburg
620030 Russian Federation
Phone: +7 (912) 511-69-43.
E-mail: maria.verh1@mail.ru

Образец цитирования:

М.Д. Верховская, В.С. Марченко «Особенности показателей иммунного ответа у пациентов с постковидным синдромом и наличием в анамнезе вируса герпеса 6-го типа (HHV-6)» // Российский иммунологический журнал, 2025. Т. 28, № 3. С. 695–702.
doi: 10.46235/1028-7221-17209-FOI

© Верховская М.Д., Марченко В.С., 2025
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

M.D. Verkhovskaya, V.S. Marchenko “Features of immune response in patients with post-COVID syndrome and a history of type 6 herpes”, Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2025, Vol. 28, no. 3, pp. 695–702.
doi: 10.46235/1028-7221-17209-FOI

© Verkhovskaya M.D., Marchenko V.S., 2025
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.46235/1028-7221-17209-FOI

для иммунной системы и организма в целом. Выявленные изменения указывают на то, что наиболее выраженные трансформации наблюдаются у пациентов с постковидным синдромом и вирусом герпеса 6-го типа в анамнезе. Это подчеркивает необходимость более детального изучения их иммунного статуса с целью разработки индивидуализированных подходов к иммунокоррекции нарушений иммунной системы у данной группы пациентов, учитывая их герпесвирусный анамнез.

Ключевые слова: вирус SARS-CoV-2, COVID-19, постковидный синдром, герпес 6-го типа, HHV-6, ВГЧ-6, иммунитет, система комплемента, фагоцитоз, НСТ

FEATURES OF IMMUNE RESPONSE IN PATIENTS WITH POST-COVID SYNDROME AND A HISTORY OF TYPE 6 HERPES

Verkhovskaya M.D.^a, Marchenko V.S.^b

^a Federal Research Institute of Viral Infections “Virom”, Ekaterinburg, Russian Federation

^b Chelyabinsk State University, Chelyabinsk, Russian Federation

Abstract. Since the end of 2019, people have been faced with infection, caused by a new strain of coronavirus — SARS-CoV-2. This disease has led to a pandemic, one of the global problems of mankind. Despite clinical manifestations of COVID-19 became milder with time, resembling features of seasonal viral infections, the persistent disturbances in various organs and systems were identified in former patients. It was found that, after suffering from COVID-19, a significant number of patients experience numerous disorders in both general health and complications of existing chronic diseases, including herpesvirus reactivation and papillomavirus infection. In this regard, the scientific community has an additional task, a comprehensive and in-depth study of post-COVID syndrome to identify ways to improve the condition of patients. Currently, it has been revealed that about 90% of the world's population is infected with herpesviruses. In some cases, one person may be found to have co-infection with different herpesviruses. Herpesvirus infections may be associated with a lot of conditions, from local labial herpes to generalized forms, malignant neoplasms and congenital malformations. It can occur both in acute and latent forms. The study of herpesvirus infection in the context of post-covid syndrome is one of the most pressing problems of modern medicine. The purpose of this study was to evaluate the changes in immune indexes in patients with post-COVID syndrome and with laboratory and clinically confirmed herpes virus type 6. To this purpose, changes in innate immune response indicators such as the complement system, phagocytic activity of neutrophils were assessed. Clinical data, immunological tests (enzyme-linked immunosorbent assay and NBT test with nitroblue tetrazolium), and statistical analysis methods (Mann–Whitney criterion) were used for the study. The results have shown that adverse reactions caused by the previous coronavirus infection are characterized by new aspects of disorders in adaptive and innate immune systems, thus leading to more serious consequences for immune system and the entire body, having been carefully studied and analyzed. The revealed changes indicate that the more pronounced disorders are observed in patients with post-COVID syndrome and a history of herpes virus type 6. This finding highlights the need for a more detailed study of their immune status, in order to develop individualized approaches to immunocorrection of immune system disorders in this group of patients, taking into account their herpesvirus history.

Keywords: SARS-CoV-2 virus, COVID-19, post-COVID syndrome, herpes type 6, HHV-6, HCV-6, immunity, complement system, phagocytosis, NBT

Работа выполнена по теме гос. заданий НИИ-ВИ «ВИРОМ» «Изучение механизмов формирования хронической вирусной инфекции у пациентов с постковидным синдромом и нарушением функций иммунной системы. Разработка патогенетических подходов к эффективной профилактике и иммунокоррекции выявленных нарушений у пациентов с «постковидным синдромом» № гос. регистрации 124031800093-5.

Введение

Коронавирусы (семейство *Coronaviridae*) представляют собой группу вирусов, характеризующихся геномом, состоящим из рибонуклеиновой кислоты (РНК). Они обладают способностью инфицировать широкий спектр хозяев, включая человека.

Коронавирусная инфекция — заболевание, вызванное новым штаммом коронавируса, SARS-

CoV-2, впервые зарегистрированное в декабре 2019 года в китайском городе Ухань [2, 7]. 11 февраля 2020 года Всемирная организация здравоохранения присвоила официальное название инфекции – COVID-19.

По данным Всемирной организации здравоохранения, на середину февраля 2025 года число подтвержденных случаев COVID-19 достигло 75 000. Из них 35 832 случая были зафиксированы в Российской Федерации, что составляет 48% от общего числа выявленных случаев по всему миру.

Несмотря на то, что наблюдается колоссальное снижение подтвержденных случаев COVID-19, с августа 2023 года по начало февраля 2025 число заболевших коронавирусной инфекцией снизилось на 97,8%, исследователи продолжают изучать долгосрочное влияние инфекции на организм человека и разрабатывать эффективные методы профилактики и борьбы с хронической формой коронавирусной инфекции, так называемый «постковидный синдром».

В научных трудах Канорский С.Г. описал хронический или постковидный синдром (post-COVID syndrome) как состояние, характеризующееся либо появлением новых симптомов, либо учащением рецидивов хронических заболеваний, сохраняющееся более 12 недель после перенесенного COVID-19 [3].

В связи с этим продолжающиеся исследования COVID-19 и, как следствие, постковидного синдрома показывают наличие взаимосвязи иммунной системы с вирусом SARS-CoV-2, что приводит к разнообразным клиническим проявлениям после перенесенного заболевания [13], в том числе реактивации уже имеющихся хронических заболеваний, таких как герпесвирусная и папилломавирусная инфекции [1].

Nalbandian A. в своем исследовании предположил, что одной из возможных причин постковидного синдрома может быть вирусная персистенция в тканях [13].

Oronsky B. и соавт. отмечают, что постковидный синдром представляет собой патологическое состояние, характеризующееся продолжительными физическими, медицинскими и когнитивными проявлениями после перенесенного COVID-19. Это состояние включает в себя устойчивую иммуносупрессию, а также фиброзные изменения в легких, сердце и сосудах [12].

Герпесвирусы – это группа патогенных ДНК-вирусов, вызывающих герпесвирусные инфекции у людей. Более 90% взрослого населения планеты инфицировано хотя бы одним из девяти известных типов этих вирусов [4].

Вирус герпеса человека 6-го типа (HHV-6, ВГЧ-6) – это широко распространенный β -герпес-вирус, тесно связанный генетически с цитоме-

галовирусом человека. В настоящее время он классифицируется на два основных подтипа: HHV-6A, обнаруживаемый преимущественно у лиц с иммунодефицитными состояниями, и HHV-6B, который является преобладающим и обнаруживается в большинстве случаев инфекции [10, 14].

ВГЧ-6 был недавно включен в перечень значимых патогенов человека и на сегодняшний день рассматривается как потенциальный этиологический агент, ассоциированный с рядом заболеваний.

Вирус был выделен в 1986 г. в клетках крови пациентов, зараженных ВИЧ [10]. Инфицирование происходит обычно на первом или втором году жизни, и к 25 годам около 95% инфицированных имеют антитела к ВГЧ-6 [11, 14, 15].

Следует уточнить, что данный вирусный агент обладает широким спектром клеточного тропизма *in vivo* и, подобно другим герпесвирусам, вызывает хроническую латентную инфекцию у человека [10, 16].

Первоначально HHV-6 классифицировали как В-лимфотропный вирус, однако дальнейшие исследования показали, что он является Т-лимфотропным вирусом, что и послужило основанием для его переименования [1, 7, 10].

Вирус способен провоцировать развитие серьезных заболеваний, особенно у лиц с ослабленным иммунитетом. В качестве иллюстрации патогенного потенциала вируса HHV-6 можно привести внезапную экзантему – доброкачественное заболевание детского возраста, ассоциированное с первичной инфекцией. Однако повторные реактивации вируса могут приводить к тяжелым формам энцефалита, особенно у пациентов после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток [10].

Пронькина Н.С. и соавт. установили, что при герпетической инфекции, как и при других вирусных инфекциях с персистенцией, наблюдаются иммунодефицитные состояния. Эти состояния характеризуются нарушением функционирования различных звеньев иммунной системы, что затрудняет полную элиминацию вируса из организма [6].

На текущий момент отсутствуют масштабные исследования, направленные на анализ состояния иммунной системы у постковидных пациентов в контексте инфекции, вызванной герпесвирусом 6-го типа.

Согласно данным, приведенным в статье Zubchenko S. и соавт., пациенты с постковидным синдромом имеют тенденцию к реактивации ВГЧ-6 и ВЭБ, что указывает на высокий риск развития различных патологий у данной когорты пациентов.

Данное исследование посвящено изучению клинических и лабораторных особенностей постковидного синдрома, сопровождающегося реактивацией герпесвирусных инфекций, таких как вирус герпеса человека 6-го типа (ВГЧ-6), цитомегаловирус (ЦМВ) и вирус Эпштейна–Барр (ВЭБ). В исследовании подчеркивается, что коинфекция SARS-CoV-2 с ВГЧ-6, ВЭБ, а также вирусами герпеса 1-го и 2-го типов (HSV-1/2) может усугублять тяжесть течения COVID-19 и, как следствие, возникновение постковидного синдрома [18].

Результаты исследования продемонстрировали, что примерно у 25% пациентов произошла реактивация вируса герпеса человека 6-го типа. Клинические проявления реактивации включали субфебрильную лихорадку, снижение функциональной активности, миалгию, психические расстройства и нарушение функций дыхательной системы [18].

Вдобавок, у пациентов с постковидным синдромом были выявлены определенные изменения в лабораторных показателях: увеличение скорости оседания эритроцитов (СОЭ), снижение уровня лимфоцитов (лимфопения), повышение количества моноцитов (моноцитоз), активация печеночных ферментов, повышение уровня С-реактивного белка (СРБ) и D-димера [18].

Авторы подчеркивают важность дальнейшего углубленного исследования рассматриваемой проблемы, что включает расширение базы данных исследований и углубление понимания вирусных инфекций.

Таким образом, предполагается, что одновременное наличие двух хронических инфекций в организме вызывает «напряженный» тип иммунного ответа. Это может приводить к истощению пула иммунных клеток, снижению эффективности иммунного ответа и ухудшению качества воспалительных реакций.

Материалы и методы

Было обследовано 39 пациентов из числа не болевших COVID-19, без герпесвирусной инфекции 6-го типа; переболевших COVID-19, без герпесвирусной инфекции 6-го типа и переболевших COVID-19, с герпесвирусной инфекцией 6-го типа. Критериями включения в группы исследований были: подтвержденный диагноз «SARS-CoV-2-инфекции» методом полимеразной цепной реакции (ПЦР), наличие IgA, IgM, IgG к вирусу SARS-CoV-2 инфекции, наличие в анамнезе герпеса 6-го типа, подтвержденного данными истории болезни.

Исследование проводилось не менее чем через 6 месяцев после перенесенной SARS-CoV-2 инфекции.

Определение групп сравнения проводилось по изменениям в показателях фагоцитарной активности нейтрофилов (активность, интенсивность фагоцитоза, фагоцитарное число нейтрофилов), НСТ-активности нейтрофилов (спонтанная активность, спонтанный индекс НСТ, индуцированная активность и индуцированный индекс) у пациентов с клинически подтвержденным вирусом герпеса 6-го типа и без данного вируса в анамнезе, болевших и не болевших COVID-19, а также по различию уровней С1-ингибитора, С3а-фрагмента комплемента, С5а-фрагмента комплемента у пациентов с присутствием герпеса 6-го типа и без данного вируса в анамнезе, болевших и не болевших COVID-19.

Таким образом, было сформировано 3 группы сравнения:

Группа 1 – пациенты без герпеса 6-го типа и не болевшие COVID-19, n = 7.

Группа 2 – пациенты без герпеса 6-го типа и переболевшие COVID-19, n = 16.

Группа 3 – пациенты с герпесом 6-го типа, переболевшие COVID-19, n = 16.

Первым этапом работы был проведен расчет в показателях фагоцитарной активности нейтрофилов (активность, интенсивность фагоцитоза, фагоцитарное число нейтрофилов), НСТ-активности нейтрофилов (спонтанная активность, спонтанный индекс НСТ, индуцированная активность и индуцированный индекс) у пациентов с клинически подтвержденным вирусом герпеса 6-го типа и без данного вируса в анамнезе, болевших и не болевших COVID-19 (табл. 1).

Вторым этапом работы был проведен расчет различия уровней С1-ингибитора, С3а-фрагмента комплемента, С5а-фрагмента комплемента у пациентов с клинически подтвержденным вирусом герпеса 6-го типа и без данного вируса в анамнезе, болевших и не болевших COVID-19 (табл. 2).

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

Клинические исследования

Анкетирование пациентов с помощью анкеты иммунологического мониторинга пациентов, данные истории болезни из программы для ЭВМ «БАРС.ЗДРАВООХРАНЕНИЕ-МИС» ГАОУЗ ОТКЗ «Городская клиническая больница № 1» г. Челябинска.

Иммунологические исследования

Уровни фагоцитарной активности (активность, интенсивность фагоцитоза, фагоцитарное число нейтрофилов), НСТ-активности нейтрофилов (спонтанная активность, спонтанный индекс НСТ, индуцированная активность и ин-

ТАБЛИЦА 1. РАЗЛИЧИЕ ФАГОЦИТАРНОЙ АКТИВНОСТИ НЕЙТРОФИЛОВ (АКТИВНОСТЬ, ИНТЕНСИВНОСТЬ ФАГОЦИТОЗА, ФАГОЦИТАРНОЕ ЧИСЛО НЕЙТРОФИЛОВ), НСТ-АКТИВНОСТИ НЕЙТРОФИЛОВ (СПОНТАННАЯ АКТИВНОСТЬ, СПОНТАННЫЙ ИНДЕКС НСТ, ИНДУЦИРОВАННАЯ АКТИВНОСТЬ И ИНДУЦИРОВАННЫЙ ИНДЕКС) У ПАЦИЕНТОВ С КЛИНИЧЕСКИ ПОДТВЕРЖДЕННЫМ ВИРУСОМ ГЕРПЕСА 6-ГО ТИПА И БЕЗ ДАННОГО ВИРУСА В АНАМНЕЗЕ, БОЛЕВШИХ И НЕ БОЛЕВШИХ COVID-19 ПРИ ДОСТОВЕРНОСТИ РАЗЛИЧИЙ $p < 0,05$

TABLE 1. DIFFERENCE IN PHAGOCYtic ACTIVITY OF NEUTROPHILS (ACTIVITY, INTENSITY OF PHAGOCYTOSIS, PHAGOCYtic NUMBER OF NEUTROPHILS), NBT ACTIVITY OF NEUTROPHILS (SPONTANEOUS ACTIVITY, SPONTANEOUS NBT INDEX, INDUCED ACTIVITY AND INDUCED INDEX) IN PATIENTS WITH CLINICALLY CONFIRMED HERPES VIRUS TYPE SIX AND WITHOUT THIS VIRUS IN THE ANAMNESIS, WHO HAD AND DID NOT HAVE COVID-19 WITH RELIABILITY DIFFERENCES $p < 0.05$

Показатель Indicator	Группа 1 Group 1 n = 7	Группа 2 Group 2 n = 16	Группа 3 Group 3 n = 16	p
Активность фагоцитоза нейтрофилов Neutrophil phagocytosis activity	40,43±5,05	52,06±3,91	35,69±2,93	$p_{1-2} < 0,05$
Интенсивность фагоцитоза нейтрофилов Intensity of neutrophil phagocytosis	0,99±0,15	2,60±0,59	0,79±0,07	$p_{1-2} < 0,05$
Фагоцитарное число нейтрофилов Phagocytic number of neutrophils	2,43±0,13	4,87±1,01	2,26±0,15	$p_{1-2} < 0,05$
НСТ-спонтанная активность NBT spontaneous activity	20,14±4,18	18,31±2,91	20,25±4,29	
НСТ-спонтанный индекс NBT spontaneous index	0,32±0,06	0,25±0,05	0,25±0,06	
НСТ-индуцированная активность NBT induced activity	63,57±5,41	55,00±3,37	63,06±4,52	$p_{2-3} < 0,05$
НСТ-индуцированный индекс NBT induced index	0,86±0,09	0,66±0,05	0,71±0,05	$p_{2-3} < 0,05$

Примечание. Группа 1 – пациенты без герпеса 6-го типа и не болевшие COVID-19, группа 2 – пациенты без герпеса 6-го типа и переболевшие COVID-19, группа 3 – пациенты с герпесом 6-го типа, переболевшие COVID-19. p – достоверность различий ($p < 0,05$).

Note. Group 1, patients without type 6 herpes and who have not had COVID-19; group 2, patients without type 6 herpes and who have had COVID-19; group 3, patients with type 6 herpes who have had COVID-19. p, the significance of the differences ($p < 0.05$).

дуцированный индекс) выявлялись с помощью метода НСТ-теста (нитросиний тетразолий) и уровни показателей С1-ингибитора, С3а и С5а компонентов комплемента проводились методом иммуноферментного на иммуноферментном анализаторе Multiscan FC Thermoscientific (Китай) с использованием наборов реагентов АО «Вектор-Бест» (Россия).

Статистическая обработка данных

Обработка и анализ данных лабораторных исследований осуществлялись с помощью Microsoft Excel версии 16.16.27 (201012). Ввиду малого объема выборок использованные статистические критерии были непараметрическими. Для оценки достоверности различий использовался кри-

ТАБЛИЦА 2. РАЗЛИЧИЯ УРОВНЕЙ С1-ИНГИБИТОРА, С3а-ФРАГМЕНТА КОМПЛЕМЕНТА, С5а-ФРАГМЕНТА КОМПЛЕМЕНТА У ПАЦИЕНТОВ С КЛИНИЧЕСКИ ПОДТВЕРЖДЕННЫМ ВИРУСОМ ГЕРПЕСА 6-ГО ТИПА И БЕЗ ДАННОГО ВИРУСА В АНАМНЕЗЕ, БОЛЕВШИХ И НЕ БОЛЕВШИХ COVID-19 ПРИ ДОСТОВЕРНОСТИ РАЗЛИЧИЙ $p < 0,05$

TABLE 2. DIFFERENCE IN LEVELS OF C1 INHIBITOR, C3a COMPLEMENT FRAGMENT, C5a COMPLEMENT FRAGMENT IN PATIENTS WITH CLINICALLY CONFIRMED HERPES VIRUS TYPE SIX AND WITHOUT THIS VIRUS IN THE ANAMNESIS, WHO HAD AND DID NOT HAVE COVID-19, WITH SIGNIFICANT DIFFERENCES $p < 0,05$

Показатель Indicator	Группа 1 Group 1 n = 16	Группа 2 Group 2 n = 12	Группа 3 Group 3 n = 16	p
С1-ингибитор C1 inhibitor	370,54±8,92	288,41±16,55	248,68±2,81	
С3а-фрагмент комплемента C3a fragment of complement	130,23±9,69	108,26±3,15	107,48±3,09	$p_{1-2} < 0,05$ $p_{1-3} < 0,05$
С5а-фрагмент комплемента C5a fragment of complement	26,03±5,61	16,55±2,23	26,91±6,84	

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. As for Table 1.

терий Манна–Уитни (U), изменения считались значимыми при значениях $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Первым этапом работы был проведен расчет в показателях фагоцитарной активности нейтрофилов (активность, интенсивность фагоцитоза, фагоцитарное число нейтрофилов), НСТ-активности нейтрофилов (спонтанная активность, спонтанный индекс НСТ, индуцированная активность и индуцированный индекс) у пациентов с клинически подтвержденным вирусом герпеса 6-го типа и без данного вируса в анамнезе, болевших и не болевших COVID-19 (табл. 1).

Согласно данным, полученным при расчете по критерию Манна–Уитни были найдены достоверные различия фагоцитарной активности нейтрофилов (активность, интенсивность фагоцитоза, фагоцитарное число нейтрофилов), НСТ-индуцированная активность и индуцированный индекс у пациентов с клинически подтвержденным вирусом герпеса 6-го типа и без данного вируса в анамнезе, болевших и не болевших COVID-19.

На втором этапе работы был проведен расчет различия уровней С1-ингибитора, С3а-фрагмента комплемента, С5а-фрагмента комплемента у пациентов с клинически подтвержденным вирусом герпеса 6-го типа и без данного вируса в анамнезе, болевших и не болевших COVID-19 (табл. 2).

Согласно данным, полученным при расчете по критерию Манна–Уитни были найдены достоверные различия различия в уровне С3а-фрагмента комплемента у пациентов с клинически подтвержденным вирусом герпеса 6-го типа и без данного вируса в анамнезе, болевших и не болевших COVID-19.

Выводы

1. Выявлены статистически значимые различия в показателях активности фагоцитоза, интенсивности фагоцитоза и фагоцитарного числа нейтрофилов во всех трех группах — пациенты без вируса герпеса 6-го типа и не болевшие COVID-19, пациенты без вируса герпеса 6-го типа и переболевшие COVID-19, пациенты с вирусом герпеса 6-го типа, переболевшие COVID-19, причем наибольшее число установлено в группе 2 (пациенты без клинически подтвержденного вируса герпеса 6-го типа, переболевшие COVID-19).

2. Достоверных различий в показателях НСТ-спонтанной активности и индекса, индуцированной активности и индекса при уровне статистической значимости $p < 0,05$, в группах пациентов без герпеса 6-го типа, не болевших COVID-19, и пациентов с герпесом 6-го типа, переболевших COVID-19, не выявлено.

3. Показатели НСТ-спонтанной активности и индекса, индуцированной активности и индекса, при уровне статистической значимости $p < 0,05$, в группе без вируса герпеса 6-го типа и

переболевшие COVID-19 достоверно ниже, чем в двух других группах.

4. Уровень С3а-фрагмента комплемента, при уровне статистической значимости $p < 0,05$, достоверно ниже в группах пациентов, перенесших COVID-19 и имеющих вирус герпеса 6-го типа, и пациентов, перенесших COVID-19 и без вируса герпеса 6-го типа.

5. Уровень С1-ингибитора фрагмента комплемента при уровне статистической значимости $p < 0,05$ значительно выше в группе пациентов, не болевших COVID-19 и без вируса герпеса 6-го типа в анамнезе.

6. Уровень С5а-фрагмента комплемента при уровне статистической значимости $p < 0,05$, достоверно ниже в группе перенесших COVID-19 и без вируса герпеса 6-го типа.

Выявленные изменения свидетельствуют о том, что наиболее значимые изменения наблюдаются у постковидных пациентов, что, в свою очередь, требует более детального исследования их иммунного статуса для формирования индивидуального подхода к иммунокоррекции нарушений иммунитета у данной группы пациентов.

Список литературы / References

1. Добрынина М.А., Зурочка А.В., Зурочка В.А., Клиника-иммунологическая характеристика постковидных пациентов с инфекционным синдромом иммунопатологии // Российский иммунологический журнал, 2024. Т. 27, № 3. С. 689-698. [Dobrynina M.A., Zurochka A.V., Zurochka V.A. Clinical and immunological characteristics of post-COVID patients with infectious immunopathology syndrome. *Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2024, Vol. 27, no. 3, pp. 689-698. (In Russ.)] doi: 10.46235/1028-7221-16845-CAI.
2. Иоселиани Д.Г. Что такое COVID-19? // Международный журнал интервенционной кардиоангиологии, 2020. № 61. С. 11-34. [Ioseliani D.G. What is COVID-19? *Mezhdunarodnyy zhurnal interventsionnoy kardioangiologii = International Journal of Interventional Cardioangiologiy*, 2020, no. 61, pp. 11-34. (In Russ.)]
3. Канорский С.Г. Постковидный синдром: распространенность и патогенез органических поражений, направления коррекции. Систематический обзор // Кубанский научный медицинский вестник, 2021. Т. 28, № 6. С. 90-116. [Kanorskiy S.G. Postcovid syndrome: prevalence and pathogenesis of organ lesions, directions of correction. A systematic review. *Kubanskiy nauchnyy meditsinskiy vestnik = Kuban Scientific Medical Bulletin*, 2021, Vol. 28, no. 6, pp. 90-116. (In Russ.)]
4. Козлов В.А., Тихонова Е.П., Савченко А.А., Кудрявцев И.В., Андропова Н.В., Анисимова Е.Н., Головкин А.С., Демина Д.В., Здитовецкий Д.Э., Калинина Ю.С., Каспаров Э.В., Козлов И.Г., Корсунский И.А., Кудлай Д.А., Кузьмина Т.Ю., Миноранская Н.С., Продеус А.П., Старикова Э.А., Черданцев Д.В., Чесноков А.Б., Шестерня П.А., Борисов А.Г. Клиническая иммунология: практическое пособие для инфекционистов. Красноярск: Поликор, 2021. 563 с. [Kozlov V.A., Tikhonova E.P., Savchenko A.A., Kudryavtsev I.V., Andronova N.V., Anisimova E.N., Golovkin A.S., Demina D.V., Zdzitovetsky D.E., Kalinina Yu.S., Kasparov E.V., Kozlov I.G., Korsunsky I.A., Kudlay D.A., Kuzmina T.Yu., Minoranskaya N.S., Prodeus A.P., Starikova E.A., Cherdantsev D.V., Chesnokov A.B., Shesternya P.A., Borisov A.G. Clinical immunology: A practical guide for infectious diseases specialists]. Krasnoyarsk: Polikor, 2021. 563 p.
5. Оперативная информация о распространении новой коронавирусной инфекции (COVID-19) по территориям, обслуживаемым ФМБА России. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://fmba.gov.ru/covid-19/informatsiya-o-novoy-koronavirusnoy-infektsii/>. [Operational information on the spread of the new coronavirus infection (COVID-19) in the territories served by the FMBA of Russia. [Electronic resource]. Available at: <https://fmba.gov.ru/covid-19/informatsiya-o-novoy-koronavirusnoy-infektsii/>.]
6. Пронькина Н.С., Булыгин Г.В., Камзалакова Н.И., Тихонова Ю.С. Характеристика параметров иммунного статуса у больных хронической герпетической инфекцией с формированием синдрома хронической усталости и иммунной дисфункции // Вестник Санкт-Петербургского университета. Медицина, 2015. № 2. С. 52-58. [Pronkina N.S., Bulygin G.V., Kamzalakova N.I., Tikhonova Yu.S. Characteristics of immune status parameters in patients with chronic herpes infection with the formation of chronic fatigue syndrome and immune dysfunction. *Vestnik Sankt-Peterburgskogo universiteta. Meditsina = Bulletin of St. Petersburg University. Medicine*, 2015. no. 2, pp. 52-58. (In Russ.)]
7. Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19): временные методические рекомендации. М., 2021. 225 с. [Электронный ресурс]. Режим доступа: https://medkirovdpo.ru/uploads/docs/2021/временные_методические_рекомендации_covid_19_v11.pdf. [Prevention, diagnosis and treatment of new coronavirus infection (COVID-19): temporary methodological recommendations. Moscow, 2021. 225 p. [Electronic resource]. Available at: https://medkirovdpo.ru/uploads/docs/2021/временные_методические_рекомендации_covid_19_v11.pdf.]
8. Ablashi D.V., Salahuddin S.Z., Josephs S.F., Imam F., Lusso P., Gallo R.C., Hung C., Lemp J., Markham P.D. HBLV (or HHV-6) in human cell lines. *Nature*, 1987, Vol. 329, no. 6136, 207. doi: 10.1038/329207a0.

9. Agut H. Deciphering the clinical impact of acute human herpesvirus 6 (HHV-6) infections. *J. Clin. Virol.*, 2011, Vol. 52, no. 3, pp. 164-171
10. Agut H., Bonnafous P., Gautheret-Dejean A. Laboratory and clinical aspects of human herpesvirus 6 infections. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2015, Vol. 28, no. 2, pp. 313-335.
11. Caserta M.T., McDermott M.P., Dewhurst S., Schnabel K., Carnahan J.A., Gilbert L., Lathan G., Lofthus G.K., Hall C.B. Human herpesvirus 6 (HHV6) DNA persistence and reactivation in healthy children. *J. Pediatr.*, 2004, Vol. 145, no. 4, pp. 478-484.
12. Nalbandian A., Sehgal K., Gupta. A., Madhavan M.V., McGroder. C., Stevens. J.S., Cook. J.R., Nordvig. A.S., Shalev D., Sehwat T.S., Ahluwalia N., Bikdeli B., Dietz D., Der-Nigoghossian C., Liyanage-Don N., Rosner G.F., Bernstein E.J., Mohan S., Beckley A.A., Seres D.S., Choueiri T.K., Uriel N., Ausiello J.C., Accili D., Freedberg D.E., Baldwin M., Schwartz A., Brodie D., Garcia C.K., Elkind M.S.V., Connors J.M., Bilezikian J.P., Landry D.W., Wan E.Y. Post-acute COVID-19 syndrome. *Nat Med.* 2021, pp. 601-615.
13. Oronsky B, Larson C., Hammond T.C., Oronsky A., Kesari S., Lybeck M., Reid T.R. A review of persistent Post-COVID Syndrome (PPCS). *Clin. Rev. Allergy Immunol.*, 2023, Vol. 64, no. 1, pp. 66-74.
14. Paces J, Strizova Z., Smrz D., Cerny J. COVID-19 and the immune system. *Physiol. Res.*, 2020, Vol. 69, no. 3, pp. 379-388.
15. Rasa S., Nora-Krukke Z., Henning N., Eliassen E., Shikova E., Harrer T., Scheibenbogen C., Murovska M., Prusty B.K. Chronic viral infections in myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome (ME/CFS). *J. Transl. Med.*, 2018, Vol. 16, no. 1, 268. doi: 10.1186/s12967-018-1644-y.
16. Sarah S., Larry K., Charles G. Principles and practice of pediatric infectious diseases. Prober Churchill Livingstone Inc., 1997.
17. Vojdani A., Vojdani E., Saidara E., Maes M. Persistent SARS-CoV-2 Infection, EBV, HHV-6 and other factors may contribute to inflammation and autoimmunity in long COVID. *Viruses*, 2023, Vol. 15, no. 2, 400. doi: 10.3390/v15020400.
18. WHO Coronavirus (COVID-19) dashboard. COVID-19 deaths (dashboard). Available at: <https://data.who.int/dashboards/covid19/cases?n=0>
19. Zubchenko S., Kril I., Nadizhko O., Matsyura O., Chopyak V. Herpesvirus infections and post-COVID-19 manifestations: a pilot observational stud. *Rheumatol. Int.*, 2022, Vol. 42, no. 9, pp. 1523-1530.

Авторы:

Верховская М.Д. — младший научный сотрудник лаборатории трансмиссивных вирусных инфекций ФБУН «Федеральный научно-исследовательский институт вирусных инфекций “Виром”» Роспотребнадзора, г. Екатеринбург, Россия
Марченко В.С. — студент факультета фундаментальной медицины ФГБОУ ВО «Челябинский государственный университет», г. Челябинск, Россия

Authors:

Verkhovskaya M.D., Junior Researcher, Laboratory of Transmissible Viral Infections, Federal Research Institute of Viral Infections “Virom”, Ekaterinburg, Russian Federation
Marchenko V.S., Student, Faculty of Fundamental Medicine, Chelyabinsk State University, Chelyabinsk, Russian Federation

Поступила 30.03.2025
Отправлена на доработку 15.04.2025
Принята к печати 25.05.2025

Received 30.03.2025
Revision received 15.04.2025
Accepted 25.05.2025

ИММУНООПОСРЕДОВАННЫЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ У ПОСТКОВИДНЫХ ПАЦИЕНТОВ И ИХ СВЯЗЬ С НАРУШЕНИЕМ АКТИВНОСТИ СИСТЕМЫ КОМПЛЕМЕНТА

Добрынина М.А.

ФБУН «Федеральный научно-исследовательский институт вирусных инфекций “Вирум”» Роспотребнадзора,
г. Екатеринбург, Россия

Резюме. Пандемия новой коронавирусной инфекции COVID-19, вызванная вирусом SARS-CoV-2, привела к далеко идущим последствиям. Вызываемые им изменения в макроорганизме могут сохраняться более 6–12 месяцев после окончания острой фазы заболевания, формируя постковидные нарушения иммунной системы. Пациенты, перенесшие острый COVID-19 как в легкой, так и в тяжелой форме, страдают от различных проявлений постковидного синдрома. Однако выраженность этих проявлений весьма вариабельна. Целью настоящего исследования стала оценка влияния степени поражения легких в остром периоде COVID-19 на выраженность клинических проявлений постковидного синдрома на примере иммуноопосредованных симптомокомплексов: аутоиммунного, пролиферативного и аллергопатологии. Обследован 131 пациент, перенесший инфекцию SARS-CoV-2. Для исследования использованы анамнестические данные из амбулаторных карт пациентов. С помощью метода ИФА-диагностики определялись IgA, IgM, IgG, специфичные к SARS-CoV-2, фрагменты комплемента C1q, C3a, C5a. В ходе исследований выявлена связь между тяжестью постковидного синдрома и тяжестью острого течения COVID-19. Вирус SARS-CoV-2 способен активировать комплемент, и активация эта сохраняется длительно (более полугода), что объясняет наличие клинических проявлений постковидного синдрома у лиц, перенесших легкую острую форму COVID-19 без поражения легких по данным компьютерной томографии и не имеющих выявленных нами ранее фенотипов поражения иммунной системы (врожденного звена — снижение экспрессии CD46 на Т-лимфоцитах и снижение экспрессии CD46 на NK-клетках, и приобретенного — снижение уровня Т-цитотоксических лимфоцитов и нарушение уровня В-клеток CD45⁺CD3⁺CD19⁺CD5⁺CD27⁺). Полученные данные свидетельствуют о том, что обследование пациентов, имеющих постковидный синдром, должно проводиться не только путем оценки их клинических характеристик, но и путем изучения состояния иммунной системы таких пациентов с целью постановки правильного диагноза и назначения этиологической и патогенетической терапии, в том числе иммунотерапии. Аутоиммун-

Адрес для переписки:

Добрынина Мария Александровна
ФБУН «Федеральный научно-исследовательский
институт вирусных инфекций “Вирум”»
Роспотребнадзора
620030, Россия, г. Екатеринбург, ул. Летняя, 23.
Тел.: 8 (343) 261-99-47.
E-mail: info@niivirom.ru

Address for correspondence:

Mariya A. Dobrynina
Federal Research Institute of Viral Infections “Virom”
23 Letnya St
Ekaterinburg
620030 Russian Federation
Phone: +7 (343) 261-99-47.
E-mail: info@niivirom.ru

Образец цитирования:

М.А. Добрынина «Иммуноопосредованные заболевания у постковидных пациентов и их связь с нарушением активности системы комплемента» // Российский иммунологический журнал, 2025. Т. 28, № 3. С. 703–710. doi: 10.46235/1028-7221-17202-IMD

© Добрынина М.А., 2025

Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

M.A. Dobrynina “Immune-mediated disorders in post-COVID patients and their relationship with impaired complement system activity”, Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2025, Vol. 28, no. 3, pp. 703–710. doi: 10.46235/1028-7221-17202-IMD

© Dobrynina M.A., 2025

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

DOI: 10.46235/1028-7221-17202-IMD

ные, пролиферативные и аллергические заболевания напрямую связаны с нарушениями иммунной системы. Обобщая результаты данного исследования, можно сделать следующие выводы: 1. Тяжесть аутоиммунных нарушений в постковидный период напрямую не связана с тяжестью заболевания, а в большей степени связана с базисной кортикостероидной терапией (ГКС) как для лечения аутоиммунных процессов, так и для лечения COVID-19. Если ГКС не используются при аутоиммунном тиреоидите, то их применение в остром периоде инфекции впоследствии снижало количество рецидивов. Тогда как при ревматоидном артрите ситуация обратная: применение ГКС в остром периоде инфекции у пациентов, уже находящихся на базисной кортикостероидной терапии, впоследствии приводит к увеличению количества рецидивов у пациентов, перенесших ковидный. 2. У пациентов, перенесших COVID, выявлена тенденция к увеличению наиболее клинически тяжелой аллергопатологии: во-первых, во всех группах (52%) в постковидный период участились обострения таких патологий, как отек Квинке, крапивница, анафилаксия, васкулит, альвеолит, бронхолит. Все это свидетельствует о том, что на ухудшение состояния этих пациентов в постковидный период повлияла перенесенная инфекция, вызванная вирусом SARS-CoV-2. Аллергические поражения кожи оказались на втором месте по частоте обострений — около 28%. 3. Отмечается тенденция к увеличению частоты обострений пролиферативных заболеваний у пациентов с более тяжелыми формами острой инфекции COVID-19. Также следует отметить, что процент таких пациентов достаточно высок — от 31,6% до 48%. 4. Вирус SARS-CoV-2 может влиять на активацию системы комплемента, что объясняет наличие клинических проявлений постковидного синдрома у лиц, перенесших острую форму COVID-19 в легкой форме без поражения легких по данным компьютерной томографии и не имеющих выявленных нами ранее фенотипов поражения иммунной системы. Полученные данные свидетельствуют о том, что обследование постковидных больных должно проводиться не только путем оценки их клинических характеристик, но и путем исследования состояния иммунной системы таких пациентов с целью постановки правильного диагноза и назначения этиологической и патогенетической терапии, в том числе иммунотерапии.

Ключевые слова: иммунная система, компьютерная томография, вирусная пневмония, система комплемента, инфекция SARS-CoV-2, постковидный синдром

IMMUNE-MEDIATED DISORDERS IN POST-COVID PATIENTS AND THEIR RELATIONSHIP WITH IMPAIRED COMPLEMENT SYSTEM ACTIVITY

Dobrynina M.A.

Federal Research Institute of Viral Infections "Virom", Ekaterinburg, Russian Federation

Abstract. The COVID-19 pandemic caused by the SARS-CoV-2 virus has led to far-reaching consequences. The changes caused in COVID-19 patients may persist for more than 6-12 months after acute phase of the disease promoting post-COVID disorders of immune system. Patients who have had acute COVID-19 in both mild and severe forms suffer from various manifestations of post-COVID syndrome. However, the severity of these manifestations is quite variable. The aim of the study was to assess the effect of lung damage extent in acute period of COVID-19 on the severity of clinical manifestations in post-COVID syndrome as exemplified by immune-mediated syndromes, i.e., autoimmune disorders, proliferative conditions, and allergopathology. 131 patients who had a history of SARS-CoV-2 infection were examined. Anamnestic data from outpatient cards of patients were used for the study. Using the ELISA diagnostics method, IgA, IgM, IgG specific to SARS-CoV-2, complement components C1q, C3a, C5a were determined. The studies revealed a connection between the severity of post-COVID syndrome and the severity of the acute COVID-19 course. The SARS-CoV-2 virus is able of activating complement, and this activation persists for a long time (more than six months). This finding explains presence of clinical manifestations of post-COVID syndrome in individuals

who have had a mild acute form of COVID-19 without CT-detected lung damage without phenotypes of immune system damage that we have previously identified (congenital – decreased expression of CD46 on T lymphocytes and decreased expression of CD46 on NK cells, and acquired – decreased level of T-cytotoxic lymphocytes and impaired level of B-cells CD45⁺CD3⁺CD19⁺CD5⁺CD27⁺). The data obtained indicate that the examination of post-COVID patients should be carried out not only by their clinical characteristics, but also by assessing markers of their immune system in order to make a correct diagnosis and prescribe etiological and pathogenetic therapy, including immune therapy. *Conclusions:* 1. Autoimmune, proliferative and allergic diseases are directly related to disorders of the immune system. The severity of autoimmune disorders in the post-COVID period is more associated with basic corticosteroid therapy (GCS) both for the treatment of autoimmune processes and for the treatment of COVID-19 (except of treating autoimmune thyroiditis). GCS treatment used in acute period of infection reduced the number of recurrent disorders. The situation is the opposite in rheumatoid arthritis: the use of GCS in the acute period of infection in patients already on basic corticosteroid therapy subsequently leads to an increase in the number of relapses in post-COVID patients. 2. In post-COVID patients, we revealed a trend towards an increase in the most clinically severe allergopathology: firstly, in all groups (52%) in the post-COVID period, exacerbations of such pathologies as Quincke's edema, urticaria, anaphylaxis, vasculitis, alveolitis, and bronchiolitis became more frequent. These findings suggest that the worse condition of these patients in the post-COVID period was influenced by the past SARS-CoV-2 infection. Allergic skin lesions were in second place in terms of the frequency of exacerbations (about 28%). 3. There is a tendency towards an increased frequency of proliferative diseases exacerbations in patients with more severe forms of acute COVID-19 infection. It should also be noted that the percentage of such patients is quite high, from 31.6% to 48%. 4. The SARS-CoV-2 virus may affect the complement activation system, thus explaining clinical manifestations of post-COVID syndrome in the persons who had a mild form of COVID-19 without evidence of lung damage immune system affection. Our data indicate that the examination of post-COVID patients should be carried out not only by assessing their clinical characteristics, but also by examining the state of the immune system in such patients in order to make a correct diagnosis and administer etiological and pathogenetic therapy, including immune therapy.

Keywords: immune system, computed tomography, viral pneumonia, complement system, SARS-CoV-2 infection, post-COVID syndrome

The work is completed on the topic of State assignments FBIS Federal Scientific Research Institute of Viral Infections “VIROM” Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Consumption “Study of the mechanisms of chronic viral infection formation in patients with post-COVID syndrome and impaired immune system functions. Development of pathogenetic approaches to effective prevention and immunocorrection of identified disorders in patients with “post-COVID syndrome” No. state registration 124031800093-5.

Introduction

The COVID-19 coronavirus pandemic caused by the SARS-CoV-2 virus has had far-reaching consequences. According to case histories, patients with post-COVID syndrome experience severe fatigue, increased fatigability, an increase in the incidence of acute respiratory viral infections per year, an increase in the recurrence of skin diseases, allergy pathologies, an increase in the recurrence of chronic infectious and non-infectious diseases of

various organs and systems. Patients were examined at least six months after recovery from acute COVID-19. Such persistent post-infectious consequences are known as post-COVID syndrome [7]. When assessing post-COVID syndrome, it is necessary to reveal the main clinical symptoms of multiorgan pathology characteristic of post-COVID patients according to the literature [3]. For example, 410 participants in a Swiss study were assessed for complaints 7-9 months after being diagnosed with COVID-19, of which 39.0% of patients reported long-term symptoms such as fatigue (20.7%), loss of taste or smell (16.8%), shortness of breath (11.7%), and headache (10.0%), including among young, previously healthy people [6]. In another study by Chinese scientists, 1,733 patients were examined 6 months after acute COVID-19, in which 9% reported a long-term sensation of palpitations and 5% reported chest pain [2]. Cognitive impairments were noted, manifested by difficulty concentrating, deteriorating memory, perception, and/or speech reproduction [8]. In a study by Chinese scientists, approximately a quarter of patients reported anxiety, depression, and sleep disturbances

6 months after COVID-19 [2]. However, reports of similar complaints after mild COVID-19 suggest a contribution to their development by dysfunction of the autonomic nervous system [1]. Long-term cognitive impairment has been noted in studies aimed at assessing the condition of patients who have suffered critical illnesses; it occurs in 20-40% of patients hospitalized with COVID-19 [10]. Ruggeri R.M. et al. (2021) write about subacute thyroiditis with clinical manifestations of thyrotoxicosis weeks after the disappearance of respiratory symptoms [9]. COVID-19 can lead to the manifestation of latent autoimmune thyroiditis in the form of new-onset Hashimoto's thyroiditis [11] or Graves' disease [5]. Endocrine manifestations of post-COVID syndrome can be a consequence of direct damage by the virus, immunological and inflammatory damage, as well as iatrogenic complications.

Thus, in the literature there are indications of various clinical pathological manifestations of post-covid syndrome, but at the same time, there is no systematization of these studies, and there is no data on the pathogenesis of the formation of clinical manifestations of post-covid syndrome. In addition, if the immune system of patients with acute coronavirus infection has been studied quite well, then the state of the immune system of post-covid patients remains practically unstudied. All this served as the basis for our studies of post-covid patients.

The aim of the study was to assess the impact of the degree of lung damage in the acute period of COVID-19 on the severity of clinical manifestations of post-COVID syndrome using the example of immune-mediated symptom complexes – auto-immune, proliferative, and allergopathology.

Materials and methods

A total of 131 patients who had recovered from SARS-CoV-2 infection were examined. Of these, 48 were men aged 20 to 76 years (mean age 55.3 years) and 83 were women aged 21 to 79 years (mean age 53.4 years). The inclusion criteria in the study groups were: confirmed diagnosis of SARS-CoV-2 infection by polymerase chain reaction (PCR), the presence of IgA, IgM to the SARS-CoV-2 virus in the acute and post-acute periods of infection and IgG to the SARS-CoV-2 virus during the recovery period, computed tomography data of the lungs on the presence or absence of changes of the “ground glass” type. This study was conducted at least 6-12 months after the infection caused by SARS-CoV-2. All patients were preliminarily examined by a general practitioner and an immunologist-allergist in order to identify concomitant diseases, as well as by doctors

of other specialties before COVID-19 to establish concomitant diagnoses. The groups were randomized by gender, age, concomitant diseases according to the χ^2 criterion. All studies were approved by the Independent Local Ethics Committee at the State Autonomous Healthcare Institution of the Republic of Chelyabinsk “City Clinical Hospital No. 1” of Chelyabinsk (protocol No. 8 dated 04/11/2022), on the basis of which these studies were conducted, and by the Independent Local Ethics Committee at the Federal Research Institute of Virology and Infection “Virom” of Rospotrebnadzor of Yekaterinburg, protocol No. 1 dated 03/22/2024, on the basis of which these studies were conducted.

Clinical research methods

- Identification of persons with post-COVID syndrome after examination by doctors: therapist, allergist-immunologist, pulmonologist, ENT doctor.
- Filling out the immunological examination card.
- Physical, laboratory and instrumental examinations for diagnosis.

Immunological research methods

ELISA diagnostic methods. Determination of the level of specific IgA, IgM, IgG to the SARS-CoV-2 coronavirus, C1 inhibitor, C3a and C5a complement components by enzyme immunoassay and immunofluorescence analysis on a Multiscan FC ThermoScientific enzyme immunoassay analyzer (China). The study was conducted using generally accepted standardized enzyme immunoassay methods (test systems of VectorBest, Russia; Cytokine LLC, Russia).

Statistical research methods

Based on the study results, a database was created in Excel (MS Office 2007). Data processing and analysis were performed using R 3.1.1 12 (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria) and Microsoft Excel version 14.0. Student's t-tests were used for parametric data; differences were considered significant at $p < 0.05$.

Equipment

The following equipment was used: Multiscan FC ThermoScientific enzyme immunoassay analyzer (China), Mindray SL-1200 A immunochemiluminometer (China), related equipment (centrifuges, shakers, thermostats, etc.), computers with software packages required for mathematical and statistical analysis of the results.

Results and discussion

According to the data presented in Table 1, reliable differences were obtained between groups KT0 and KT1-2, as well as KT0 and KT3-4 – the frequency

TABLE 1. SEVERITY OF CLINICAL MANIFESTATIONS OF THE AUTOIMMUNE SYMPTOM COMPLEX IN POST-COVID PATIENTS DEPENDING ON THE DEGREE OF LUNG DAMAGE IN THE ACUTE PERIOD OF COVID-19

Diseases with increased incidence of relapses or first identified after clinical recovery from acute COVID-19 infection/degree of lung damage according to CT data	Total number of patients examined (n = 131)		Group 1 CT 0 (n = 38)		Group 2 CT 1-2 (n = 68)		Group 3 CT 3-4 (n = 25)	
	Abs.	%	Abs.	%	Abs.	%	Abs.	%
Rheumatoid arthritis	30	22.9	4	10.2	19	27.9 $p_{1-2} < 0.05$	7	28.0
Autoimmune thyroiditis	20	15.3	11	29.0	7	10.3 $p_{1-2} < 0.05$	2	8.0 $p_{1-3} < 0.05$

Note. Reliability of differences between groups p_1-p_2 , p_1-p_3 , p_2-p_3 . Differences $p < 0.05$ (Student's T-test) were considered reliable.

TABLE 2. SEVERITY OF CLINICAL MANIFESTATIONS OF THE SYMPTOM COMPLEX OF ALLERGOPATHOLOGY IN POST-COVID PATIENTS DEPENDING ON THE DEGREE OF LUNG DAMAGE IN THE ACUTE PERIOD OF COVID-19

Diseases with increased incidence of relapses or first identified after clinical recovery from acute COVID-19 infection/degree of lung damage according to CT data	Total number of patients examined (n = 131)		Group 1 CT 0 (n = 38)		Group 2 CT 1-2 (n = 68)		Group 3 CT 3-4 (n = 25)	
	Abs.	%	Abs.	%	Abs.	%	Abs.	%
Eczema, contact dermatitis, psoriasis	36	27.5	11	29.0	18	26.7	7	28.0
Quincke's edema, urticaria, anaphylaxis, vasculitis, alveolitis, bronchiolitis	68	51.9	20	52.3	35	51.5	13	52.0
Seasonal rhinitis, conjunctivitis	32	24.4	10	26.3	17	25.0	5	20.0
Bronchial asthma	19	14.5	4	10.5	14	20.6	1	4.0

Note. As for Table 1.

of exacerbations of rheumatoid arthritis in the post-COVID period is significantly higher in the group with lung damage of less than 50% in the acute period of COVID-19 compared to the group of patients without lung damage, while the frequency of exacerbations of autoimmune thyroiditis is significantly higher in patients without lung damage in the acute period of COVID-19 compared to the other groups.

When analyzing the effect of the degree of lung damage in the acute period of COVID-19 infection on the increase in the frequency of exacerbations of allergic diseases in the post-COVID period (Table 2),

no dependence was found. However, at the same time, a tendency towards an increase in the most clinically severe allergopathology was revealed in post-COVID patients: firstly, in all groups (52%), exacerbations of such pathologies as Quincke's edema, urticaria, anaphylaxis, vasculitis, alveolitis, and bronchiolitis became more frequent in the post-COVID period. All this indicates that the deterioration of the condition of these patients in the post-COVID period was influenced by the infection caused by the SARS-CoV-2 virus. Allergic skin lesions were in second place in terms of exacerbation frequency – about 28%.

TABLE 3. SEVERITY OF CLINICAL MANIFESTATIONS OF THE PROLIFERATIVE SYMPTOM COMPLEX IN POST-COVID PATIENTS DEPENDING ON THE DEGREE OF LUNG DAMAGE IN THE ACUTE PERIOD OF COVID-19

Diseases with increased incidence of relapses or first identified after clinical recovery from acute COVID-19 infection/degree of lung damage according to CT data	Total number of patients examined (n = 131)		Group 1 CT 0 (n = 38)		Group 2 CT 1-2 (n = 68)		Group 3 CT 3-4 (n = 25)	
	Abs.	%	Abs.	%	Abs.	%	Abs.	%
Frequent lymphadenitis	41	31.3	13	34.2	20	29.4	8	32.0
Benign tumors: fibroids, cysts, polyps, fibroadenomas, endometriosis	54	41.2	12	31.6	30	44.1	12	48.0

Note. As for Table 1.

TABLE 4. ANALYSIS OF COMPLEMENT SYSTEM PARAMETERS IN POST-COVID PATIENTS DEPENDING ON THE DEGREE OF LUNG DAMAGE ACCORDING TO COMPUTED TOMOGRAPHY DATA IN THE ACUTE PERIOD OF COVID-19

Degree of lung damage according to CT data / Level of complement system indicators	Group 1 CT0 (n = 38) M±m, p	Group 2 CT 1-2 (n = 68) M±m, p	Group 3 CT 3-4 (n = 25) M±m, p	Group 4 Conditionally healthy individuals who have not had COVID-19 (n = 16) M±m, p
C1q, mcg/mL	273.9±31.7	275.5±27.9	199.1±20.3 p ₁₋₃ < 0.05 p ₂₋₃ < 0.05 p ₃₋₄ < 0.05	287.2±31.2
C3a, ng/mL	109.7±6.4	115.3±6.9	106.3±13.0	119.7±18.3
C5a, ng/mL	27.2±3.5 p ₁₋₄ < 0.05	25.2±2.6 p ₂₋₄ < 0.05	27.1±5.9 p ₃₋₄ < 0.05	15.1±2.7

Note. As for Table 1.

The frequency of exacerbations of proliferative diseases did not show significant differences between patient groups depending on the degree of lung damage in the acute period of infection (Table 3), but there was a tendency for the frequency of exacerbations to increase in patients with more severe forms of acute COVID-19 infection. It should also be noted that the percentage of such patients is quite high – from 31.6% to 48%. These data further indicate that post-COVID patients develop multiple organ pathology.

One of the key indicators of immune status is the complement system. Disturbances in the activity of the complement system can lead to serious consequences for various organs and tissues – the central nervous system, liver, lungs, and the immune system as a whole [4]. Therefore, the next stage of the study was

to compare the level of complement system indicators in post-COVID patients depending on the severity of acute coronavirus infection (Table 4).

As can be seen from Table 4, all patients who have had COVID-19 have increased activity of the complement fragment C5a, which indicates long-term (at least six months) stimulation of the classical complement activation pathway. Also noteworthy is the persistent decrease in the activity of C1q, which is responsible for the normalization of activated complement, in the most clinically severe patients.

Conclusions

Autoimmune, proliferative and allergic diseases are directly related to disorders of the immune system.

Summarizing the results of this study, we can make the following conclusions:

1. The severity of autoimmune disorders in the post-COVID period is not directly related to the severity of the disease, but is more associated with basic corticosteroid therapy (GCS) both for the treatment of autoimmune processes and for the treatment of COVID-19. If GCS are not used for autoimmune thyroiditis, then their use in the acute period of infection subsequently reduced the number of relapses. Whereas with rheumatoid arthritis, the situation is the opposite: the use of GCS in the acute period of infection in patients already on basic corticosteroid therapy subsequently leads to an increase in the number of relapses in post-COVID patients.

2. In post-COVID patients, a tendency towards an increase in the most clinically severe allergopathology was revealed: firstly, in all groups (52%) in the post-COVID period, exacerbations of such pathologies as Quincke's edema, urticaria, anaphylaxis, vasculitis, alveolitis, and bronchiolitis became more frequent. All this indicates that the deterioration of the condition of these patients in the post-COVID period was influenced by the past

infection caused by the SARS-CoV-2 virus. Allergic skin lesions were in second place in terms of the frequency of exacerbations – about 28%.

3. There is a tendency towards an increase in the frequency of exacerbations of proliferative diseases in patients with more severe forms of acute COVID-19 infection. It should also be noted that the percentage of such patients is quite high – from 31.6% to 48%.

4. The SARS-CoV-2 virus can affect the activation of the complement system, which explains the presence of clinical manifestations of post-COVID syndrome in individuals who have had an acute form of COVID-19 in a mild form without lung damage according to computed tomography data and who do not have the phenotypes of immune system damage that we have previously identified. The data obtained indicate that the examination of post-COVID patients should be carried out not only by assessing their clinical characteristics, but also by examining the state of the immune system of such patients in order to make a correct diagnosis and prescribe etiological and pathogenetic therapy, including immune therapy.

References

1. Dani M., Dirksen A., Taraborrelli P., Torocastro M., Panagopoulos D., Sutton R., Lim R.B. Autonomic dysfunction in 'long-COVID': rationale, physiology and management strategies. *Clin. Med. (Lond.)*, 2021, Vol. 21, no. 1, pp. e63-e67.
2. Huang C., Huang L., Wang Y., Li X., Ren L., Gu X., Kang L., Guo L., Liu M., Zhou X., Luo J., Huang Z., Tu S., Zhao Y., Chen L., Xu D., Li Y., Li C., Peng L., Li Y., Xie W., Cui D., Shang L., Fan G., Xu J., Wang G., Wang Y., Zhong J., Wang C., Wang J., Zhang D., Cao B. 6-month consequences of COVID-19 in patients discharged from hospital: a cohort study. *Lancet*, 2021, Vol. 397, no. 10270, pp. 220-232.
3. Kanorskii S.G. Post-covid syndrome: prevalence and pathogenesis of organ damage, directions of correction. Systematic review. *Kuban Scientific Medical Bulletin*, 2021, Vol. 28, no. 6, pp. 90-116. (In Russ.)
4. Kunz N., Kemper C. Complement Has Brains-Do Intracellular Complement and Immunometabolism Cooperate in Tissue Homeostasis and Behavior. *Front. Immunol.*, 2021. Vol. 12, 629986. doi: 10.3389/fimmu.2021.629986.
5. Mateu-Salat M., Urgell E., Chico A. SARS-COV-2 as a trigger for autoimmune disease: report of two cases of Graves' disease after COVID-19. *J. Endocrinol. Invest.*, 2020, Vol. 43, no. 10, pp. 1527-1528.
6. Nehme M., Brillard O., Chappuis F., Courvoisier D.S., Idris Guessous I., CoviCare Study Team CoviCare Study Team. Prevalence of symptoms more than seven months after diagnosis of symptomatic COVID-19 in an outpatient setting. *Ann. Intern. Med.*, 2021, Vol. 174, no. 9, pp. 1252-1260.
7. Pierce J.D., Shen Q., Cintron S.A., Hiebert J.B. Post-COVID-19 syndrome. *Nurs. Res.*, 2022, Vol. 71, no. 2, pp. 164-174.
8. Ritchie K., Chan D., Watermeyer T. The cognitive consequences of the COVID-19 epidemic: collateral damage? *Brain Commun.*, 2020. Vol. 2, no. 2, fcaa069. doi: 10.1093/braincomms/fcaa069
9. Ruggeri R.M., Campenni A., Siracusa M., Frazzetto G., Gullo D. Subacute thyroiditis in a patient infected with SARS-COV-2: an endocrine complication linked to the COVID-19 pandemic. *Hormones (Athens)*, 2021, Vol. 20, no. 1, pp. 219-221.

10. Sakusic A., Rabinstein A.A. Cognitive outcomes after critical illness. *Curr. Opin. Crit. Care*, 2018, Vol. 24, no. 5, pp. 410-414.
11. Tee L.Y, Hajanto S., Rosario B.H. COVID-19 complicated by Hashimoto's thyroiditis. *Singapore Med. J.*, 2021, Vol. 62, no. 5, 265. doi: 10.11622/smedj.2020106.

Автор:

Добрынина М.А. — к.м.н., старший научный сотрудник
лаборатории трансмиссивных вирусных инфекций
ФБУН «Федеральный научно-исследовательский
институт вирусных инфекций “Виром”»
Роспотребнадзора, г. Екатеринбург, Россия

Author:

Dobrynina M.A., PhD (Medicine), Senior Researcher,
Laboratory of Transmissible Viral Diseases, Federal Research
Institute of Viral Infections “Virom”, Ekaterinburg, Russian
Federation

Поступила 30.03.2025

Отправлена на доработку 07.04.2025

Принята к печати 25.05.2025

Received 30.03.2025

Revision received 07.04.2025

Accepted 25.05.2025

ХРОНИЧЕСКАЯ ИНФЕКЦИЯ, ВЫЗВАННАЯ ВИРУСОМ ЭПШТЕЙНА–БАРР, КАК ФАКТОР ПРОГРЕССИРОВАНИЯ ПОСТКОВИДНОГО СИНДРОМА: РОЛЬ ДИСФУНКЦИИ СИСТЕМЫ КОМПЛЕМЕНТА КРОВИ И НЕЙТРОФИЛЬНОГО ЗВЕНА ИММУНИТЕТА

Мосунов А.А.¹, Парфентьева Т.М.²

¹ ФБУН «Федеральный научно-исследовательский институт вирусных инфекций “Вирум”» Роспотребнадзора,
г. Екатеринбург, Россия

² ФГБОУ ВО «Челябинский государственный университет», г. Челябинск, Россия

Резюме. Коронавирусная инфекция COVID-19, которую способен вызвать вирус SARS-CoV-2, продолжает вызывать опасения не только из-за проявлений вируса в острой фазе болезни, но и из-за дальнейших возможных последствий этой инфекции. Анализ иммунологических показателей демонстрирует выраженное влияние ВЭБ-инфекции на течение постковидного синдрома. У пациентов отмечается не только количественное изменение популяций иммунокомпетентных клеток, но и качественные нарушения их функциональной активности. Эти изменения особенно заметны в Т-клеточном звене иммунитета и системе врожденного иммунного ответа, что создает предпосылки для длительного персистирования симптоматики. Вирус герпеса человека 4-го типа, также известный как вирус Эпштейна–Барр (ВЭБ), является одной из самых распространенных инфекций и способен оставаться в организме зараженного пожизненно. Взаимодействие между иммунными факторами и ВЭБ является сложным. В норме, когда человек инфицирован ВЭБ, иммунная система вырабатывает специфические антитела, которые нацелены на вирус и помогают вывести его из организма. Однако ВЭБ может ускользать от иммунной системы различными способами, позволяя ему устанавливать постоянную инфекцию в организме. ВЭБ может нарушать функцию иммунной системы, затрудняя организму борьбу с инфекцией. Будучи первой линией защиты организма от вторжения ВЭБ, врожденный иммунитет не только противостоит неспецифической инфекции, но и инициирует процесс адаптивного иммунитета. Полученные данные подчеркивают важность учета ВЭБ-статуса при оценке пациентов с постковидным синдромом. Выявленные нарушения комплемента и фагоцитоза могут

Адрес для переписки:

Мосунов Андрей Алексеевич
ФБУН «Федеральный научно-исследовательский
институт вирусных инфекций “Вирум”»
Роспотребнадзора
620030, Россия, г. Екатеринбург, ул. Летняя, 23.
Тел.: 8 (902) 027-09-24.
E-mail: andrey.mosunov@list.ru

Address for correspondence:

Andrey A. Mosunov
Federal Research Institute of Viral Infections “Virom”
23 Letnya St
Ekaterinburg
620030 Russian Federation
Phone: +7 (902) 027-09-24.
E-mail: andrey.mosunov@list.ru

Образец цитирования:

А.А. Мосунов, Т.М. Парфентьева «Хроническая инфекция, вызванная вирусом Эпштейна–Барр, как фактор прогрессирования постковидного синдрома: роль дисфункции системы комплемента крови и нейтрофильного звена иммунитета» // Российский иммунологический журнал, 2025. Т. 28, № 3. С. 711–718. doi: 10.46235/1028-7221-17204-CEB

© Мосунов А.А., Парфентьева Т.М., 2025
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

A.A. Mosunov, T.M. Parfentyeva “Chronic Epstein–Barr virus infection as a modulator of post-COVID syndrome severity: Implications of complement cascade dysregulation and neutrophil immune dysfunction”, *Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal*, 2025, Vol. 28, no. 3, pp. 711–718. doi: 10.46235/1028-7221-17204-CEB

© Mosunov A.A., Parfentyeva T.M., 2025
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.46235/1028-7221-17204-CEB

служить важными маркерами для прогнозирования течения заболевания и разработки персонализированных подходов к терапии. Особую значимость приобретает мониторинг этих показателей в динамике. Исследование выявило значимое влияние хронической ВЭБ-инфекции на иммунопатогенез ПКС, проявляющееся угнетением комплемента (снижение C3a, C5a) и фагоцитарной активности нейтрофилов, что коррелирует с тяжестью клинических проявлений. Полученные данные свидетельствуют о синергизме постковидного синдрома и ВЭБ, приводящем к дисрегуляции врожденного иммунитета, хроническому воспалению и нарушению интерфероновой реакции. Практическая значимость работы заключается в обосновании мониторинга ВЭБ-статуса и иммунологических маркеров для персонализированной терапии ПКС. Результаты подчеркивают необходимость дальнейшего изучения долгосрочных последствий хронических инфекций у пациентов с постковидным синдромом, включая риски аутоиммунных осложнений и разработку таргетных вмешательств.

Ключевые слова: постковидный синдром, вирус Эпштейна–Барр, система комплемента, фагоцитоз нейтрофилов, бактерицидная активность нейтрофилов

CHRONIC EPSTEIN–BARR VIRUS INFECTION AS A MODULATOR OF POST-COVID SYNDROME SEVERITY: IMPLICATIONS OF COMPLEMENT CASCADE DYSREGULATION AND NEUTROPHIL IMMUNE DYSFUNCTION

Mosunov A.A.^a, Parfentyeva T.M.^b

^a Federal Research Institute of Viral Infections “Virom”, Ekaterinburg, Russian Federation

^b Chelyabinsk State University, Chelyabinsk, Russian Federation

Abstract. COVID-19 infection caused by SARS-CoV-2 virus remains a significant concern not only due to acute manifestations but also because of long-term sequelae, including post-COVID syndrome (PCS). Immunological studies demonstrate a pronounced effect of Epstein–Barr virus (EBV) infection on PCS progression. Patients exhibit both quantitative alterations in immune cell populations and qualitative impairments in their functional activity, particularly affecting T cell immunity and innate immune responses, which contribute to the syndrome persistence. EBV (human herpesvirus 4), one of the most prevalent chronic infections, establishing lifelong latency. The interplay between EBV and host immunity is complex: while the immune system generates virus-specific antibodies to control infection, EBV employs immune evasion strategies, impairing host defenses and facilitating viral persistence. Key findings reveal that chronic EBV infection significantly disrupts the immunopathogenesis of PCS, notably *via* complement suppression (reduced C3a, C5a) and impaired neutrophil phagocytosis, correlating with clinical severity. This synergy between PCS and EBV leads to innate immune dysregulation, chronic inflammation, and interferon response dysfunction. These results underscore the importance of EBV status assessment in PCS patients. Complement and phagocytosis markers may serve as prognostic indexes, guiding personalized therapeutic strategies, including immunomodulation and complement inhibition. Further research is needed to evaluate long-term risks, including autoimmune complications, and to develop targeted interventions.

Keywords: post-COVID syndrome, Epstein–Barr virus, complement system, neutrophil phagocytosis, neutrophil bactericidal activity

Работа выполнена по теме гос. заданий НИИВИ «ВИРОМ» «Изучение механизмов формирования хронической вирусной инфекции у пациентов с постковидным синдромом и нарушением функций иммунной системы. Разработка патогенетических подходов к эффективной профилактике и иммунокоррекции выявленных нарушений у

пациентов с «постковидным синдромом» № гос. регистрации 124031800093-5.

Введение

Постковидный синдром — актуальная проблема, требующая дополнительного изучения, поскольку он может существенно влиять на ка-

чество жизни пациентов и вносить дополнительные трудности в способы лечения. В отдельном исследовании описана частота встречаемости различных симптомов, которые присутствующих в течение 2 мес. у пациентов после выписки из стационаров и отрицательных тестов на SARS-CoV-2. Наиболее часто можно было выделить общую слабость, одышку, снижение качества жизни, нарушение функции внешнего дыхания. Несколько реже отмечали миокардит, персистирующие неврологические симптомы, нарушение вкуса и/или обоняния, психоэмоциональные нарушения [3].

В ряде статей приводятся данные о том, что постковидный синдром может затрагивать как перенесших болезнь в тяжелой форме, так и тех, у кого была легкая или умеренная степень заболевания. Это подчеркивает необходимость длительного наблюдения и поддержки всех пациентов, перенесших COVID-19, независимо от тяжести первичной инфекции [6, 9].

Исследование Mahmud R., Rahman M.M. и соавт. показало, что механизмы, лежащие в основе этих симптомов, включают в себя длительное воспаление и дисфункцию иммунной системы. Повышенные уровни воспалительных маркеров и изменения в клеточном составе крови указывают на длительную активацию компонентов иммунной системы [12].

В работе Добрыниной М.А. и соавт. рассматриваются изменения в функционировании натуральных киллеров (NK-клеток) у пациентов, выздоровевших после COVID-19. Важнейшие аспекты статьи включают вывод о значительном снижении числа NK-клеток у пациентов в острой фазе заболевания и их медленное восстановление лишь спустя несколько месяцев после выздоровления. Авторы также подчеркивают изменение функциональной активности NK-клеток, что проявляется в снижении их цитотоксичности и способности выделять ключевые цитокины, такие как интерферон-гамма [1].

Другая работа Добрыниной М.А. и соавт. посвящена изучению изменений в экспрессии маркеров CD45 и CD46 на различных субпопуляциях лимфоцитов у пациентов, перенесших COVID-19. Авторы анализируют изменения в иммунных клетках, которые могут быть связаны с длительными последствиями заболевания [2].

Отдельно проведен анализ Т-клеточного звена и его нарушения связи с другими отделами иммунной системы. Статья авторов Roncati L., Lusenti B. исследует уровень активности Th1-клеток у пациентов с тяжелыми формами COVID-19. Исследование показывает, что в таком случае важно обратить внимание на белок CD26/DPP4, который играет ключевую роль в подавлении

Th1-ответа, что существенно влияет на способность организма бороться с вирусом. В этой связи была обнаружена низкая активность Th1-клеток, которые являются критически важными для уничтожения внутриклеточных патогенов, таких как вирусы. В результате такой эффект приводит к ослабленному иммунному ответу [10].

Исходя из вышесказанного, можно сделать вывод о длительной иммуносупрессии, которую может вызвать постковидный синдром.

Вирус герпеса человека 4-го типа, также известный как вирус Эпштейна–Барр (ВЭБ), относится к семейству *Herpesviridae*. Будучи одной из самых распространенных инфекций, ВЭБ способен оставаться в организме зараженного пожизненно, при этом не вызывая симптомов, которые могли бы указать на его наличие.

Исследования Yu H., Robertson E.S. выявили его роль как причинного фактора в развитии разнообразного спектра заболеваний, включая доброкачественные заболевания (инфекционный мононуклеоз (ИМ)), заболевания полости рта, заболевания, связанные с функциональными нарушениями иммунитета, рассеянный склероз (РС) [13].

ВЭБ был впервые обнаружен в 1964 году при лимфоме Беркитта, и позже было обнаружено, что он также связан с другими типами лимфомы, включая лимфому Ходжкина, неходжкинскую лимфому у пациентов после трансплантации и ВИЧ-инфицированных лиц, Т-клеточную лимфому и NK/Т-клеточную лимфому [7].

Инфекция ВЭБ вызывает активацию В-клеток, что приводит к увеличению продукции IgM, IgG и IgA. В ходе инфекционного ИМ обнаруживаются антитела как против латентных, так и против литических вирусных антигенов.

В-клетки участвуют в адаптивных иммунных реакциях и вырабатывают специфические антитела. Антитела к антигену капсида вируса (VCA), иммуноглобулину М (IgM) и IgA вырабатываются на ранних стадиях инфекционного периода и сохраняются в течение нескольких недель или месяцев, прежде чем исчезнуть, тогда как антитела IgG против VCA обычно достигают пика через 2–4 месяца после заражения, а затем, хотя их количество снижается, сохраняются в организме. Инфицированные В-клетки также вырабатывают антитела против gp350, gp42 и gHgL, ингибируя связывание В-клеток ВЭБ и слияние вирусов, ограничивая распространение вируса и предотвращая рецидив инфекции.

Генерация ВЭБ-специфических CD8⁺ и CD4⁺Т-клеток значительно повышена в популяции ВЭБ-инфицированных лиц. CD8⁺ цитотоксические Т-клетки нацелены и атакуют ВЭБ-инфицированные клетки, распознавая вирусные

белковые пептиды, представленные молекулами главного комплекса гистосовместимости класса I (МНС-I) на инфицированных клетках, и играют противовирусную роль [8].

Одно из существующих исследований в области иммунологии изучало возможные эффекты ВЭБ и постковидного синдрома, которые патологии могут совместно оказывать на организм. У пациентов с постковидным состоянием выявлены некоторые лабораторные показатели, такие как повышенная СОЭ, лимфопения, моноцитоз, активация печеночных ферментов, СРБ и D-димера. Пациенты с постковидным состоянием и реактивированными герпесвирусными инфекциями (ВЭБ, ВГЧ6) имеют высокий риск развития различных патологий, в том числе ревматологических заболеваний [14].

Материалы и методы

Были исследованы 45 пациентов из числа перенесших SARS-CoV-2 инфекцию. Критерием включения в группы исследований были: подтвержденный диагноз «COVID-19» методом ПЦР, наличие IgA, IgM, G к вирусу SARS-CoV-2, наличие антител к капсидному белку ВЭБ в сыворотке крови (IgA, IgM, IgG к VCAVEB), определение ВЭБ в слюне методом ПЦР. Кроме того, критериями включения являлись наличие жалоб на усталость, боль, учащение обострений хронических инфекционных заболеваний кожи, клер, слизистых, верхних и нижних дыхательных путей, почек.

Критерием исключения из групп исследования были: острые воспалительные процессы, хронические и острые вирусные инфекции (остальные герпесвирусные инфекции, ВПЧ, гепатит В, гепатит С, ВИЧ).

Исследование проводилось не менее чем через 6 месяцев после перенесенной SARS-CoV-2 инфекции. Все пациенты были предварительно обследованы врачом-терапевтом и иммунологом-аллергологом для выявления сопутствующих заболеваний.

Пациенты были разделены на следующие группы:

Группа 1 — пациенты, состоящие на диспансерном учете с диагнозом «Состояние после COVID-19 (U09.9)», без клинических и лабораторных признаков наличия хронической герпетической инфекции, вызванной ВЭБ, $n = 19$.

Группа 2 — пациенты, состоящие на диспансерном учете с диагнозом «Состояние после COVID-19 (U09.9)», с наличием клинических и лабораторных признаков наличия хронической герпетической инфекции, вызванной ВЭБ, $n = 19$.

Группа 3 — пациенты, условно здоровые, без жалоб, не состоящие на диспансерном учете и без клинических и лабораторных признаков наличия инфекции вызванной ВЭБ, $n = 7$.

Все исследования были одобрены независимым локальным этическим комитетом при ФНИИВИ «Виром» Роспотребнадзора г. Екатеринбурга, протокол № 1 от 22.03.2024 на базе которого проводились данные исследования.

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

Общеклинические исследования

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

Иммунологические исследования

Из иммунологических показателей проводилась оценка фагоцитарной активности частиц латекса диаметром 1,7 мкм нейтрофилами (активность фагоцитоза, интенсивность фагоцитоза, фагоцитарное число); спонтанная и индуцированная НСТ-активность нейтрофилов определялись морфологическим методом (световая микроскопия с использованием микроскопов Olympus (Япония)). Фагоцитарную активность нейтрофилов определяли по их способности поглощать частицы латекса [5].

Определение фрагментов системы комплемента проводилось методом иммуноферментного анализа на тест-системе АО «Вектор-Бест ИФА».

Статистическая обработка данных

Статистическая обработка результатов исследований проводилась стандартными методами с определением средней арифметической вариационного ряда (M) и ошибки средней арифметической (m). Результаты исследования количественных параметров в группах сравнения представлены в виде $M \pm m$, где M — средняя арифметическая, m — стандартная ошибка средней.

Из-за недостаточного размера выборок использовались непараметрические методы анализа вместо параметрического. Согласно литературным данным, непараметрические методы обладают хорошей чувствительностью и могут выявить даже малые различия между группами. Для оценки достоверности различий использовался критерий Манна–Уитни (U), изменения

считались статистически значимыми при значении $p < 0,05$ [4].

Результаты и обсуждение

Сравнительный анализ иммунологических профилей трех клинических групп выявил устойчивые паттерны дисрегуляции гуморального и клеточного иммунитета при сочетании постковидного синдрома и хронической ВЭБ-инфекции. Результаты проведенного статистического анализа представлены в таблице 1.

Статистически значимые отклонения в системе комплемента, включая снижение уровня С3а и С5а, коррелировали с выраженностью клинических проявлений у пациентов группы ПКС+ВЭБ+.

Нарушения фагоцитарной активности нейтрофилов, подтвержденные снижением индекса фагоцитоза и индуцированной НСТ-активности, демонстрируют сочетанное влияние SARS-CoV-2 и ВЭБ на врожденные иммунные механизмы. Полученные данные указывают на синергетический эффект вирусных патогенов в модуляции ключевых иммунных путей, что проявляется в персистенции воспалительных маркеров и функциональном истощении эффекторных клеток.

Проведенный анализ иммунологических показателей у пациентов с постковидным синдромом (ПКС) на фоне хронической инфекции, вызванной ВЭБ, выявил ряд значимых нарушений, отражающих дисрегуляцию врожденного и адаптивного иммунитета. У пациентов группы 1 (ПКС+ВЭБ–) наблюдалось умеренное снижение уровня С1-ингибитора ($275,18 \pm 28,64$) по сравнению с группой 3 (здоровые, $370,54 \pm 87,92$), что может указывать на компенсаторную активацию системы комплемента в ответ на персистирующее воспаление. Однако наиболее выраженные отклонения зафиксированы в группе 2 (ПКС+ВЭБ+), где уровень С3а ($107,17 \pm 4,84$) и С5а ($23,04 \pm 5,63$) был ниже, чем в группе 1 ($108,92 \pm 3,57$ и $28,45 \pm 5,21$ соответственно), что согласуется с гипотезой о супрессивном влиянии ВЭБ на каскад комплемента. Снижение С5а, ключевого медиатора хемотаксиса нейтрофилов, коррелирует с угнетением фагоцитарной активности: индекс фагоцитоза нейтрофилов в группе 2 ($1,12 \pm 0,19$) был значимо ниже, чем в группе 1 ($1,69 \pm 0,62$), что может способствовать нарушению элиминации патогенов и персистенции вирусных частиц.

Интересно, что активность фагоцитоза нейтрофилов в группе 2 ($40,13 \pm 4,74$) практически не отличалась от группы 1 ($40,53 \pm 4,37$), однако фагоцитарное число нейтрофилов ($2,68 \pm 0,24$) и спонтанная НСТ-активность ($17,40 \pm 2,67$) были

снижены, что свидетельствует о нарушении кислородозависимого киллинга. Это может быть связано с истощением функционального резерва клеток на фоне хронической антигенной стимуляции при коинфекции SARS-CoV-2 и ВЭБ. Снижение индуцированной НСТ-активности в группе 2 ($56,07 \pm 4,11$), по сравнению с группой 3 ($63,14 \pm 5,30$), подтверждает гипотезу о митохондриальной дисфункции нейтрофилов, характерной для длительного COVID-19.

Повышение уровня С1-ингибитора в группе 3 ($370,54 \pm 87,92$) относительно групп с ПКС отражает физиологический контроль над активацией комплемента, тогда как его снижение при ПКС может способствовать избыточному образованию мембраноатакующих комплексов, повреждающих эндотелий. Это согласуется с данными о роли комплемента в патогенезе микротромбозов при постковидном синдроме. У пациентов группы 2 комбинированное воздействие SARS-CoV-2 и ВЭБ, вероятно, усиливает дисбаланс регуляторных белков комплемента, что усугубляет эндотелиальную дисфункцию и способствует персистенции симптомов.

Важным аспектом является взаимодействие SARS-CoV-2 и ВЭБ на уровне иммунной модуляции. ВЭБ, индуцируя латентную инфекцию в В-лимфоцитах, может нарушать презентацию антигенов SARS-CoV-2, что приводит к формированию атипичных клонов Т-клеток и хроническому воспалению. Кроме того, супрессия интерферонового ответа, характерная для ВЭБ, может ограничивать противовирусную защиту, способствуя реактивации SARS-CoV-2. Это создает порочный круг, поддерживающий иммунную дисрегуляцию.

Полученные данные подчеркивают необходимость персонализированного подхода к терапии пациентов с ПКС и латентной ВЭБ-инфекцией. Коррекция выявленных нарушений, таких как гипоактивность комплемента и дисфункция нейтрофилов, может включать применение ингибиторов комплемента или иммуномодуляторов, направленных на восстановление фагоцитарной активности. Дальнейшие исследования должны быть сосредоточены на изучении долгосрочных последствий сочетанной патологии постковидного синдрома и ВЭБ, включая риск развития аутоиммунных осложнений.

Таким образом, хроническая ВЭБ-инфекция у пациентов с постковидным синдромом ассоциирована с комплексным нарушением регуляции комплемента, фагоцитоза и оксидативного метаболизма нейтрофилов, что требует интеграции противовирусной и иммунокорректирующей терапии в клиническую практику.

ТАБЛИЦА 1. ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ ПАЦИЕНТОВ ПОСТКОВИДНЫХ ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКОЙ ВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИЕЙ ВЭБ

TABLE 1. IMMUNOLOGICAL PARAMETERS OF POSTCOVID PATIENTS WITH CHRONIC EBV VIRAL INFECTION

Показатель Indicator	Группа 1 Постковид ⁺ ВЭБ ⁺ Group 1 post-COVID ⁺ EBV ⁺ n = 19	Группа 2 Постковид ⁺ ВЭБ ⁺ Group 2 post-COVID ⁺ EBV ⁺ n = 19	Группа 3 Постковид ⁺ ВЭБ ⁺ Group 3 post-COVID ⁺ EBV ⁺ n = 7
С1-ингибитор C1 inhibitor	275,18±28,64	259,21±27,66	290,32±55,05
С3а	108,92±3,57	107,17±4,84	130,23±9,69
С5а	28,45±5,21	23,04±5,63	26,03±5,61
Активность фагоцитоза нейтрофилов Neutrophil phagocytosis activity	40,53±4,37 снижена reduced	40,13±4,74	40,43±5,05
Индекс фагоцитоза нейтрофилов Neutrophil phagocytosis index	1,69±0,62	1,12±0,19	0,99±0,15
Фагоцитарное число нейтрофилов Phagocytic number of neutrophils	3,69±0,98	2,68±0,24	2,43±0,13
НСТ-спонтанная активность NBT-spontaneous activity	20,74±4,20	17,40±2,67	20,14±4,18
НСТ-спонтанная индекс NBT is a spontaneous index	0,26±0,06	0,22±0,04	0,32±0,06
НСТ-индуцированная активность NBT-induced activity	60,95±4,23 завышена overestimated	56,07±4,11	63,14±5,30
НСТ-индуцированная индекс NBT-induced index	0,70±0,05	0,65±0,04	0,86±0,09

Примечание. Для оценки достоверности различий использовался критерий Манна–Уитни (U), изменения считались статистически значимыми при значении $p < 0,05$.

Note. Mann–Whitney U test was used to assess the reliability of differences, with changes considered statistically significant at $p < 0.05$.

Выводы

1. Проведенное исследование демонстрирует значимое влияние хронической инфекции ВЭБ на иммунопатогенез постковидного синдрома (ПКС). Анализ трех клинических групп выявил устойчивые нарушения в системе комплемента и функциональной активности нейтрофилов у пациентов с сочетанной патологией (ПКС⁺ВЭБ⁺). Снижение уровня ключевых компонентов комплемента (С3а, С5а) и угнетение фагоцитарного индекса нейтрофилов в данной

группе свидетельствуют о супрессивном воздействии ВЭБ на врожденные иммунные механизмы. Эти изменения коррелируют с клиническими проявлениями, такими как хроническая усталость и респираторные нарушения, что подчеркивает роль дисрегуляции иммунитета в персистенции симптомов.

2. Методологическая часть работы основана на комплексной оценке иммунологических параметров, включая фагоцитарную активность нейтрофилов, НСТ-тест и уровень фрагментов

комплемента. Применение непараметрических методов статистики позволило выявить значимые различия между группами, несмотря на ограниченный размер выборки. Результаты подтверждают гипотезу о синергетическом эффекте SARS-CoV-2 и ВЭБ, проявляющемся в истощении функционального резерва иммукомпетентных клеток и нарушении кислородозависимого киллинга.

3. Обсуждение полученных данных акцентирует внимание на механизмах взаимодействия вирусных патогенов. Показано, что ВЭБ-индуцированная латенция в В-лимфоцитах может нарушать антигенную презентацию, способствуя формированию атипичных Т-клеточных клонов и хроническому воспалению. Одновременно супрессия интерферонового ответа создает условия для реактивации SARS-CoV-2, формируя порочный круг иммунной дисрегуляции. Эти процессы усугубляются дисбалансом регуляторных белков комплемента, что повышает риск эндотелиальной дисфункции и микротромбозов.

4. Практическая значимость исследования заключается в обосновании необходимости интеграции оценки ВЭБ-статуса и мониторинга иммунологических маркеров (С3а, С5а, фагоцитарный индекс) в алгоритмы ведения пациентов с ПКС. Персонализированные терапевтические стратегии, направленные на коррекцию выявленных нарушений, могут включать применение ингибиторов комплемента и иммуномодуляторов. Перспективным направлением дальнейших исследований является изучение долгосрочных последствий коинфекции, включая риск аутоиммунных осложнений и разработку превентивных мер.

5. Таким образом, работа вносит вклад в понимание сложных иммунопатологических механизмов, лежащих в основе сочетанного воздействия SARS-CoV-2 и ВЭБ, и предлагает новые подходы к диагностике и терапии пациентов с постковидным синдромом. Полученные данные подчеркивают важность междисциплинарного подхода в решении проблем, связанных с длительными последствиями COVID-19.

Список литературы / References

1. Добрынина М.А., Зурочка А.В., Комелькова М.В., Ло Ш. Исследование нарушения натуральных киллеров у пациентов, перенесших COVID-19 // Российский иммунологический журнал, 2022. Т. 25, № 2. С. 161-166. [Dobrynina M.A., Zurochka A.V., Komelkova M.V., Lo Sh. Study of natural killer cell disorders in patients who have had COVID-19. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2022, Vol. 25, no. 2, pp. 161-166. (In Russ.)] doi: 10.22138/2500-0918-2022-19-3-294-303.
2. Добрынина М.А., Зурочка А.В., Комелькова М.В., Ло Ш., Зурочка В.А., Ху Д., Рябова Л.В., Сарапульцев А.П. Исследование экспрессии CD45⁺ и CD46⁺ на субпопуляциях лимфоцитов периферической крови постковидных пациентов // Российский иммунологический журнал, 2022, Т. 25, № 4. С. 431-436. [Dobrynina M.A., Zurochka A.V., Komelkova M.V., Lo Sh., Zurochka V.A., Hu D., Ryabova L.V., Sarapultsev A.P. Study of CD45⁺ and CD46⁺ expression in subpopulations peripheral blood lymphocytes of post-COVID patients. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2022, Vol. 25, no. 4, pp. 431-436. (In Russ.)] doi: 10.46235/1028-7221-1160-SOC.
3. Канорский С.Г. Постковидный синдром: распространенность и патогенез органических поражений, направления коррекции. Систематический обзор // Кубанский научный медицинский вестник, 2021. № 28. С. 90-116. [Kanorsky S.G. Post-COVID syndrome: prevalence and pathogenesis of organ damage, directions of correction. Systematic review. *Kubanskiy nauchnyy meditsinskiy vestnik = Kuban Scientific Medical Bulletin*, 2021, no. 28, pp. 90-116. (In Russ.)]
4. Лакин Г.Ф., Медик В.А. Статистика в медицине и биологии. Теоретическая статистика. М.: Медицина, 2000. Т. 1. 454 с. [Lakin G.F., Medic V.A. Statistics in medicine and biology. Theoretical statistics]. Moscow: Meditsina, 2000. Vol. 1. 454 p.
5. Фрейдлин И.С. Методы изучения фагоцитирующих клеток при оценке иммунного статуса человека: учебное пособие. Ленинград, 1986. 37 с. [Freidlin I.S. Methods for studying phagocytic cells when assessing a person's immune status: a textbook]. Leningrad, 1986. 37 p.
6. Afroze F., Arafat S.M., Ahmed C.M., Alam B., Banu S., Islam M.Z., Mahfuz M., Qadri F., Bhuiyan T.R., Parvin I., Ackhter M.M., Islam F., Sultana M., Sultana E., Rahaman M.F.U., Khan A.H., Hasan M.N., Ahmed S., Chisti M.J., Ahmed T. Evolution of long COVID over two years in hospitalised and non-hospitalised survivors in Bangladesh: a longitudinal cohort study. *J. Glob. Health*, 2025, Vol. 15, 04075. doi: 10.7189/jogh.15.04075.
7. Damania B., Kenney S.C., Raab-Traub N. Epstein-Barr virus: Biology and clinical disease. *Cell*, 2022, Vol. 185, no. 20, pp. 3652-3670.

8. Huang W., Bai L., Tang H. Epstein-Barr virus infection: the micro and macro worlds. *Viol. J.*, 2023, Vol. 20, no. 1, 220. doi: 10.1186/s12985-023-02187-9.
9. Kogevinas M., Karachaliou M., Espinosa A., Iraola-Guzmán S., Castaño-Vinyals G., Delgado-Ortiz L., Farré X., Blay N., Pearce N., de Basea M.B., Nogués E.A., Dobaño C., Moncunill G., de Cid R., Garcia-Aymerich J. Risk, determinants, and persistence of long-COVID in a population-based cohort study in Catalonia. *BMC Med.*, 2025, Vol. 23, no. 1, 140. doi: 10.1186/s12916-025-03974-7.
10. Luca R., Beatrice L. The «moonlighting protein» able to explain the th1 immune lockdown in severe COVID-19 // *Medical Hypotheses*. – 2020. – №11. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32679426/>.
11. Moss D.J., Burrows S.R., Khanna R. EBV: immunobiology and host response. In: Arvin A., Campadelli-Fiume G., Mocarski E., Moore P.S., Roizman B., Whitley R., Yamanishi K., editors. *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*. Cambridge: Cambridge University Press; 2007. Chapter 51. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK47360/>.
12. Reaz M., Mujibur R., Mohammad A.R., Farhana B.M., Jakaria B.S., Shahidul I., Mohammed M. Post-COVID-19 syndrome among symptomatic COVID-19 patients: A prospective cohort study in a tertiary care center of Bangladesh. *PLoS One*, 2021, Vol. 16, no. 14, e0249644. doi: 10.1371/journal.pone.0249644.
13. Yu H., Robertson E.S. Epstein-Barr virus history and pathogenesis. *Viruses*, 2023, Vol. 15, no. 3, 714. doi: 10.3390/v15030714.
14. Zubchenko S., Kril I., Nadizhko O., Matsyura O., Chopyak V. Herpesvirus infections and post-COVID-19 manifestations: a pilot observational study. *Rheumatol. Int.*, 2022, Vol. 42, no. 9, pp. 1523-1530.
15. WHO Coronavirus (COVID-19) dashboard. COVID-19 deaths (dashboard). Available at: URL: <https://data.who.int/dashboards/covid19/deaths/>.

Авторы:

Мосунов А.А. — младший научный сотрудник лаборатории трансмиссивных вирусных инфекций ФБУН «Федеральный научно-исследовательский институт вирусных инфекций “Виром”» Роспотребнадзора, г. Екатеринбург, Россия

Парфентьева Т.М. — студент ФГБОУ ВО «Челябинский государственный университет», г. Челябинск, Россия

Authors:

Mosunov A.A., Junior Researcher, Laboratory of Transmissible Viral Diseases, Federal Research Institute of Viral Infections “Virom”, Ekaterinburg, Russian Federation

Parfentyeva T.M., Student, Chelyabinsk State University, Chelyabinsk, Russian Federation

Поступила 30.03.2025

Отправлена на доработку 03.04.2025

Принята к печати 25.05.2025

Received 30.03.2025

Revision received 03.04.2025

Accepted 25.05.2025

ЭКСПРЕССИЯ РЕЦЕПТОРОВ ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА ПОД ДЕЙСТВИЕМ ВАКЦИННЫХ ШТАММОВ ВИРУСА ВЕТРЯНОЙ ОСПЫ *IN VIVO*

Зотова А.В.¹, Нагиева Ф.Г.¹, Баркова Е.П.¹, Краскевич Д.А.¹,
Свитич О.А.^{1, 2}

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

² ФГАОУ «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ (Сеченовский университет), Москва, Россия

Резюме. Профилактика заболеваний, вызванных вирусом ветряной оспы (ВВО), с помощью вакцинации стоит в приоритете программы Всемирной организации здравоохранения по искоренению социально значимых и демографически важных инфекций, интегрируясь в программу развития Здравоохранения Российской Федерации, одним из направлений которой является включение вакцинации против ветряной оспы в Национальный календарь профилактических прививок. Математическая модель на основе эпидемиологических данных прогнозирует, что охват вакцинацией должен составлять не менее 60%, чтобы обеспечить существенное снижение заболеваемости ветряной оспой, а также при сохранении адекватного уровня охвата, вероятно, снизится заболеваемость и опоясывающим герпесом в долгосрочной перспективе. Успешное применение живых вакцин для профилактики заболеваний, связанных с ВВО, расширяет количество зарегистрированных вакцин и стран, включивших вакцинацию в национальные программы иммунизации. Разработка отечественной вакцины является необходимым условием в рамках реализации программы импортозамещения. НИИВС им. Мечникова были выделены и охарактеризованы дикие штаммы ВВО, которые могут быть использованы для создания вакцин. Стандартными методами изучения эффективности живых вакцин против вируса ветряной оспы являются определения параметров адаптивного иммунитета по таким показателям, как общий уровень антител к ветряной оспе (GMI), средние геометрические титры антител (GMT) в определенных временных промежутках, средний геометрический кратный прирост (GMFI) антител к ВВО в тот же период времени, уровень серопозитивности (определяется как процент субъектов, у которых титр антител $\geq 1:8$). Однако оценка по параметрам влияния на врожденный иммунитет не изучается рутинно, только в рамках научных исследований. Для оценки врожденного иммунного ответа, как один из вариантов исследования эффективности вакцинации, можно использовать

Адрес для переписки:

Зотова Анна Вячеславовна
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова»
105064, Россия, Москва,
Малый Казенный пер., 5а, стр. 2.
Тел.: 8 (999) 507-52-27.
E-mail: zotova@instmech.ru

Address for correspondence:

Anna V. Zotova
I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera
5a Maly Kazenny Lane, Bldg 2
Moscow
105064 Russian Federation
Phone: +7 (999) 507-52-27.
E-mail: zotova@instmech.ru

Образец цитирования:

А.В. Зотова, Ф.Г. Нагиева, Е.П. Баркова,
Д.А. Краскевич, О.А. Свитич «Экспрессия рецепторов
врожденного иммунитета под действием вакцинных
штаммов вируса ветряной оспы *in vivo*» // Российский
иммунологический журнал, 2025. Т. 28, № 3. С. 719–724.
doi: 10.46235/1028-7221-17107-EOI

© Зотова А.В. и соавт., 2025

Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

A.V. Zotova, F.G. Nagieva, E.P. Barkova, D.A. Kraskevich,
O.A. Svitich “Expression of innate immunity receptors under
the *in vivo* influence of vaccine Varicella Zoster virus strains”,
Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii
Zhurnal, 2025, Vol. 28, no. 3, pp. 719–724.
doi: 10.46235/1028-7221-17107-EOI

© Zotova A.V. et al., 2025

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

DOI: 10.46235/1028-7221-17107-EOI

экспрессию генов Toll-подобных рецепторов (*TLR*) в ответ на введение вакцин. Гены *TLR* кодируют рецепторы, распознающие структурные компоненты РНК- и ДНК-содержащих вирусов, в том числе вируса ветряной оспы. Уровни экспрессии *TLR2*, *TLR4*, *TLR9*, в свою очередь, являются маркерами активности врожденного иммунитета, которые крайне важны в ответ на введение вакцин. В ходе данной научной работы штаммы вируса ветряной оспы, полученные в лаборатории НИИВС Мечникова, были оценены на способность индуцировать врожденный иммунный ответ по маркерам *TLR2*, *TLR4* и *TLR9*. Полученные результаты позволили выделить оптимальный экспериментальный образец для дальнейшего изучения в направлении получения эффективной вакцины против инфекций, вызываемых вирусом ветряной оспы.

Ключевые слова: вирус ветряной оспы, VZV, живая вакцина, иммунный ответ, *TLR2*, *TLR4*, *TLR9*, Toll-подобные рецепторы, живая аттенуированная вакцина

EXPRESSION OF INNATE IMMUNITY RECEPTORS UNDER THE *IN VIVO* INFLUENCE OF VACCINE VARICELLA ZOSTER VIRUS STRAINS

Zotova A.V.^a, Nagieva F.G.^a, Barkova E.P.^a, Kraskevich D.A.^a,
Svitich O.A.^{a, b}

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

^b I. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation

Abstract. Vaccine prevention of disorders caused by the Varicella Zoster virus (VZV) is a priority of the World Health Organization's program for eradication of socially significant and demographically important infections, being integrated into the Russian Federal healthcare program, by including VZV vaccination in the National schedule of vaccine prophylaxis. A mathematical model based on epidemiological data predicts that the vaccination coverage should be at least 60%, in order to ensure a significantly reduced incidence of chickenpox. The incidence of Herpes Zoster is also likely to decrease at later terms, while maintaining an adequate coverage level. Successful implementation of live vaccines to prevent the VZV-associated high-risk disorders is proceeds with expanding number of vaccines registered in the countries that have included vaccination in their National immunization programs. Development of a domestic vaccine is a pre-requisite for the import-replacing programs. The Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera has isolated and characterized wild strains of VZV that may be used to develop vaccines. Standard methods for studying the effectiveness of live VZV vaccines include assessment of adaptive immunity parameterd based on such indices as total level of antibodies to varicella zoster (GMI), geometric mean antibody titers (GMT) at certain time intervals, geometric mean multiple increase (GMFI) of antibodies to VZV over the same time period, and the level of seropositivity (defined as the percentage of subjects with an antibody titer > 1:8). However, the assessment of VZV effects on innate immunity is not studied routinely, being applied only for research purposes. To evaluate the innate immune response as an index of vaccination efficiency, one may use expression of Toll-like receptor (TLR) genes in response to vaccine administration. *TLR* genes encode immune receptors that recognize the structural components of RNA and DNA-containing viruses, including VZV. In turn, the *TLR2*, *TLR4*, and *TLR9* expression levels are the markers of innate immunity activation, which is highly important when assessing post-vaccinal immune response. In the course of this study, the VZV strains obtained at the I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera were evaluated for their ability to induce innate immune response tested by the *TLR2*, *TLR4* and *TLR9* markers. The results obtained have enabled us to specify an optimal experimental sample for further studies aimed at obtaining an effective vaccine against VZV-associated infectious conditions.

Keywords: Varicella Zoster virus, VZV, live vaccine, immune response, *TLR2*, *TLR4*, *TLR9*, Toll-like receptors, live attenuated vaccine

Введение

Антигенная нагрузка, возникающая при первичном заражении вирусом ветряной оспы (ВВО) в результате виремии и последующих поражений кожи, как правило, является достаточной для пожизненной иммунной защиты от ветряной оспы. Однако ввиду того, что ВВО является внутриклеточной персистирующей инфекцией с возможной реактивацией и развитием клинической картины с тяжелыми формами связанных заболеваний и осложнениями, вакцинация является стратегией выбора в рамках системы здравоохранения. Цель вакцинации — имитация иммунного ответа без признаков и симптомов естественной инфекции. Вакцина против ветряной оспы была впервые одобрена для использования в рамках национальной программы для детей в США в 1995 году и впоследствии была включена в программы иммунизации детей во многих странах мира [7]. По данным ВОЗ (Всемирная организация здравоохранения), на 2025 год 47 стран включили в Национальные календари прививок вакцинацию против ветряной оспы, количество стран увеличивается с каждым годом. ВОЗ рекомендует включить вакцинацию против ветряной оспы в плановые программы иммунизации в странах, где ветряная оспа представляет значительную проблему для общественного здравоохранения, а охват вакцинацией должен поддерживаться на уровне выше 80% [6]. На сегодняшний день две дозы вакцины против ветряной оспы, введенные в детском возрасте, эффективны для выработки иммунитета против вируса ветряной оспы, по крайней мере в течение нескольких десятилетий [4].

Первая вакцина для профилактики ВО была приготовлена М. Такахаси из вируса ветряной оспы, выделенного из поражения эпителия кожи маленького мальчика (штамм Ока) (Takahashi, 1984). Изолят аттенуировали 11 пассажем в клетках человека при 34 °C и 12 пассажами в клетках морских свинок. Последующие вакцины были сделаны из окинского штамма после дополнительных пассажей в диплоидных клетках человека WI-38 или MRC-5, которые обычно используются для приготовления вакцин [3]. Состав доступных вакцин отличается по различным вариантам штаммов. Биоаналогичные вакцины были изготовлены из местных изолятов в Южной Корее (GC Biopharma) или из штамма Ока (Merck в США; GlaxoSmithKline в ЕС; Бикен в Японии; Sinovac в Китае) [5].

Разработка отечественных вакцин на основе собственных запатентованных штаммов вируса ветряной оспы является перспективным направлением развития в области вакцинопрофилактики [1]. Данная работа полностью отражается в

стратегии развития Здравоохранения Российской Федерации, в том числе по разработкам вакцин для обеспечения Национального календаря профилактических прививок. Одним из критериев эффективности действия вакцин является стимулирование врожденного иммунитета. Для оценки эффективности разрабатываемых вакцин предлагается проведение исследований по изучению экспрессии Toll-подобных (TLR) рецепторов как одних из основных факторов врожденного иммунитета.

Целью данной работы явилось определение динамики экспрессии генов *TLR2*, *TLR4* и *TLR9* в мононуклеарных клетках крови при инфицировании различными вакцинными штаммами вируса ветряной оспы *in vivo*.

Материалы и методы

Штаммы вирусов

Вакцина для профилактики ветряной оспы живая аттенуированная Varilrix (PV № ЛСР-001354/08, GlaxoSmithKline Biologicals s.a., Бельгия), вакцина против ветряной оспы живая Varivax (PV № ЛП-(000071)-(РГ-RU), MERCK SHARP & DOHME, Corp., США). Штаммы ВВО из коллекции НИИВС им. И.И. Мечникова: штамм vFiraVax (Патент Российской Федерации № 2693440 «Штамм vFiraVax для получения аттенуированной живой культуральной вакцины для профилактики ветряной оспы»), штаммы pFiraVax, vZelVax, pZelVax.

Лабораторные животные

Экспериментальные работы проводили на мышах линии BALB/c, мыши-самцы (питомник «Филиал Андреевка ФГБУН НЦБМТ ФМБА России»). Протокол исследования с использованием лабораторных животных был одобрен Локальным советом по этике при ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова. Работа с лабораторными животными проводилась в соответствии с правилами 3Rs, принятыми W.M.S. Russell и R.L. Burch в 1956 г.

Иммунизация мышей штаммами вируса ветряной оспы

Эксперимент *in vivo* проводили путем подкожного заражения животных исследуемыми штаммами вируса ветряной оспы. Животных разделили на 6 групп. Мышам 1-й группы водили подкожно штамм vFiraVax (НИИВС им. Мечникова) по 1 и 100 доз. Мышам 2-й группы водили подкожно штамм pFiraVax (НИИВС им. Мечникова) по 1 и 100 доз. Мышам 3-й группы водили подкожно штамм vZelVax (НИИВС им. Мечникова) по 1 и 100 доз. Мышам 4-й группы водили подкожно штамм pZelVax (НИИВС им. Мечникова) по 1 и 100 доз. Мышам 5-й группы водили подкожно вакцину сравнения Varilrix. Мышам 6-й группы,

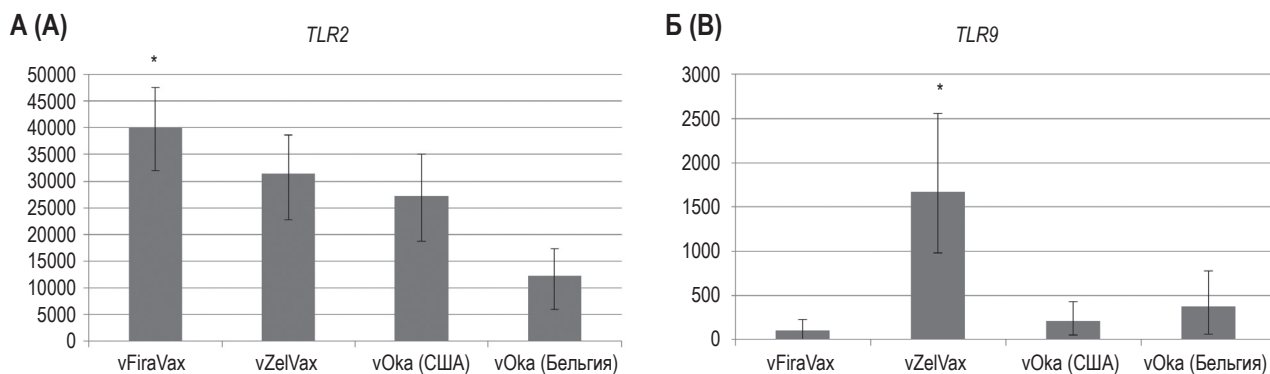


Рисунок 2. Экспрессия генов *TLR2* (А) и *TLR9* (Б) в МНК под действием различных вариантов вакцинных препаратов ВВО

Figure 2. The expression of *TLR2* (A) and *TLR9* (B) genes in MNCs under the influence of various variants of VZV vaccine

водили подкожно Varivax. Через 1 час, 1 сутки и 4 суток у мышей брали кровь для исследований. Схема эксперимента представлена на рисунке 1 (см. 3-ю стр. обложки).

Выделение РНК из мононуклеаров периферической крови

РНК выделяли из мононуклеаров периферической крови (МНК) с использованием комплектов реагентов «РИБО-сорб» (ООО «ИЛС», Россия) строго в соответствии с протоколами. Выделенную РНК хранили при температуре минус 70 °С. Реакцию обратной транскрипции (ОТ) проводили с использованием реагентов из набора «ОТ-1» (ООО «НПФ Синтол», Россия) [2].

Определение уровня экспрессии Toll-подобных рецепторов

Определение динамики уровня экспрессии генов *TLR2*, *TLR4*, *TLR9* проводили методом ПЦР в режиме реального времени с использованием реактивов из «Набора для проведения ПЦР-РВ в присутствии интеркалирующего красителя SYBR Green I» (ООО «НПФ Синтол», Россия) и специально синтезированных праймеров (ООО «НПФ Синтол», Россия). Работа выполнена с использованием прибора ДТ-96 (ООО «НПФ ДНК-технология», Россия).

Результаты и обсуждение

Toll-подобные рецепторы являются ключевыми факторами врожденного иммунитета в отношении вирусов и бактерий, что объясняет повышенный интерес к изучению их экспрессии на протяжении инфекционного процесса, в том числе имитированного с помощью вакцинации. Исследование динамики экспрессии генов *TLRs* в клетках крови может служить инструментом для оценки иммунного ответа на введение живой вакцины.

В ходе работы проводилась оценка экспрессии генов *TLR2*, *TLR4*, *TLR9* у мышей линии BALB/c

в динамике — через час, на 1-е и 4-е сутки. По результатам экспрессии делали вывод о влиянии экспериментальных штаммов вируса ветряной оспы на иммунный ответ после инфицирования.

Кандидатные штаммы vFiraVax и vZelVax индуцировали более выраженную экспрессию гена *TLR2* в МНК относительно контрольных вакцинных препаратов и практически не индуцировали экспрессию гена *TLR4* МНК относительно контрольных вакцинных препаратов. Кандидатный штамм vZelVax приводил к значительной экспрессии гена *TLR9* в МНК мышей (рис. 2).

У мышей линии BALB/c, инфицированных штаммом vFiraVax, наблюдается увеличение экспрессии гена *TLR2* и снижение экспрессии генов *TLR4* и *TLR9*. У мышей линии BALB/c, инфицированных штаммом vZelVax, наблюдается увеличение экспрессии гена *TLR2*, увеличение экспрессии гена *TLR9*, снижение экспрессии гена *TLR4*.

Заключение

Работа проводилась с целью получения оптимального по заданным характеристикам образца для дальнейшей разработки экспериментальной кандидатной вакцины для профилактики заболеваний, вызванных вирусом ветряной оспы. В ходе научной работы были оценены штаммы вируса ветряной оспы, полученные в лаборатории НИИВС Мечникова, в сравнении со штаммами зарегистрированных препаратов на способность индуцировать врожденный иммунный ответ по маркерам *TLR2*, *TLR4* и *TLR9*. Полученные данные свидетельствуют об эффективном стимулировании генов врожденного иммунитета, таких как *TLR2* и *TLR9*, вакцинным штаммом vZelVax, который может быть использован в дальнейшем для создания отечественной вакцины.

Список литературы / References

1. Лавров В.Ф., Свитич О.А., Казанова А.С., Кинкулькина А.Р., Зверев В.В. Varicella Zoster-вирусная инфекция: иммунитет, диагностика и моделирование *in vivo* // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии, 2019. Т. 96, № 4. С. 82-89. [Lavrov V.F., Svitich O.A., Kazanova A.S., Kinkulkin A.R., Zverev V.V. Varicella Zoster virus infection: immunity, diagnosis and *in vivo* modeling. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2019, Vol. 96, no. 4, pp. 82-89. (In Russ.)]
2. Свитич О.А., Лавров В.Ф., Кинкулькина А.Р., Филина А.Б., Нагиева Ф.Г., Сидоров А.В., Алаторцева Г.И., Кукина П.И., Скандарян А.А., Зверев В.В. Разработка систем тестирования экспрессионных профилей генов врожденного иммунитета, позволяющих проводить оценку иммунологической эффективности вакцин против VZV-инфекции // Санитарный врач, 2017. № 12. С. 17-22. [Svitich O.A., Lavrov V.F., Kinkulkin A.R., Filina A.B., Nagieva F.G., Sidorov A.V., Alatorseva G.I., Kukina P.I., Iskandaryan A.A., Zverev V.V. Development of systems for testing the expression profiles of innate immunity genes, allowing for the assessment of the immunological efficacy of vaccines against VZV infection. *Sanitarnyy vrach = Sanitary Doctor*, 2017, no. 12, pp. 17-22. (In Russ.)]
3. Arvin A.M., Moffat J.F., Abendroth A., Oliver S.L. Varicella-zoster Virus. Genetics, Pathogenesis and Immunity. Springer, 2023. 280 p.
4. Lee Y.H., Choe Y.J., Lee J., Kim E., Lee J.Y., Hong K., Yoon Y., Kim Y.-K. Global varicella vaccination programs. *Clin. Exp. Pediatr.*, 2022, Vol. 65, pp. 555-562.
5. Moon J.Y., Seo J., Lee J., Park D. Assessment of attenuation of varicella-zoster virus vaccines based on genomic comparison. *J. Med. Virol.*, 2023, Vol. 95, no. 3, e28590. doi: 10.1002/jmv.28590.
6. Varicella and herpes zoster vaccines: WHO position paper, June 2014. *Wkly Epidemiol. Rec.*, 2014, Vol. 89, pp. 265-288.
7. Wang W., Pan D., Fu W., Ye X., Han J., Yang L., Jia J., Liu J., Zhu R., Zhang Y., Liu C., Ye J., Selariu A., Que Y., Zhao Q., Wu T., Li Y., Zhang J., Cheng T., Zhu H., Xia N. Development of a skin- and neuro-attenuated live vaccine for varicella. *Nat. Commun.*, 2022, Vol. 13, no. 1, 824. doi: 10.1038/s41467-022-28329-1.

Авторы:

Зотова А.В. — к.фарм.н., старший научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

Нагиева Ф.Г. — д.м.н., заведующая лабораторией гибридных клеточных культур ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

Баркова Е.П. — к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории гибридных клеточных культур ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

Authors:

Zotova A.V., PhD (Pharmacy), Senior Researcher, Laboratory of Molecular Immunology, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

Nagieva F.G., PhD, MD (Medicine), Head, Laboratory of Hybrid Cell Cultures, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

Barkova E.P., PhD (Biology), Leading Researcher, Laboratory of Hybrid Cell Cultures, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

Краскевич Д.А. — научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

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

Kraskevich D.A., Researcher, Laboratory of Molecular Immunology, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

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

Поступила 29.03.2025
Отправлена на доработку 06.05.2025
Принята к печати 25.05.2025

Received 29.03.2025
Revision received 06.05.2025
Accepted 25.05.2025

ОСОБЕННОСТИ ГУМОРАЛЬНЫХ ФАКТОРОВ ИММУННОГО ОТВЕТА ПРИ ОСТРОМ ПОСТВИРУСНОМ РИНОСИНУСИТЕ У ЛИЦ, ПЕРЕНЕСШИХ КОРЬ

Корнова Н.В.¹, Гизингер О.А.², Газиев А.Р.², Зырянова К.С.¹,
Белошангин А.С.¹

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

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

Резюме. Корь как острое вирусное заболевание с высокой контагиозностью, передающееся воздушно-капельным путем, среди инфекционной патологии лидирует как по количеству заболевших, так и по наличию осложнений со стороны всех органов и систем человека. По данным ВОЗ, в 2024 году было зарегистрировано более 17,3 миллиона случаев кори по всему миру, а Российской Федерации за истекший год, по данным Роспотребнадзора зафиксировано более 18 977 случаев заболевания и это количество продолжает расти. Особенности заболевания в эпидемиологический сезон зима-осень 2024 года были выраженные иммунные нарушения и осложнения со стороны верхних дыхательных путей. Цель — оценить состояние гуморальных факторов иммунного ответа при остром поствирусном риносинусите у лиц, перенесших корь. Проведено проспективное, открытое клиническое исследование. Уровень коревых антител изучен по содержанию IgG и IgM в сыворотке крови у лиц от 19 до 55 лет. Сбор и анализ статистических данных, а также проведение исследований осуществлялся в ООО «Лаборатория Гемотест», Консультационно-диагностическом центре Российского университета дружбы народов имени Патриса Лумумбы (РУДН), Москва, Россия. Для определения специфических IgG, IgM в сыворотке крови использован метод ИФА и тест системы АО «Вектор-Бест» (г. Новосибирск, Россия). Определение концентрации цитокинов в отделяемом со слизистой оболочки полости носа проведено с применением метода ИФА. У пациентов с коревым поствирусным острым риносинуситом обнаружены высокие концентрации специфических IgM в сыворотке крови у 25% и высокие концентрации IgG у 75%. На фоне острого риносинусита у пациентов, перенесших корь, выявлены снижение секреторного IgA в 3,1 раза в назальном секрете относительно показателей здоровых людей, повышение в сыворотке крови IL-1β в 2,35 раза, IL-6 в 3,17 раза, TNFα в 3,78 раза, повышение IL-10 в 1,96 раза, IL-8 в 9,15 раза, что свидетельствует о дисбалансе регулирующих воспа-

Адрес для переписки:

Корнова Наталья Викторовна
ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный
медицинский университет» Министерства
здравоохранения РФ
454141, Россия, г. Челябинск, ул. Воровского, 64.
Тел.: 8 (932) 010-00-06.
E-mail: Korkmazov74@gmail.com

Address for correspondence:

Natalya V. Kornova
South Ural State Medical University
64 Vorovsky St
Chelyabinsk
454141 Russian Federation
Phone: +7 (932) 010-00-06.
E-mail: Korkmazov74@gmail.com

Образец цитирования:

Н.В. Корнова, О.А. Гизингер, А.Р. Газиев,
К.С. Зырянова, А.С. Белошангин «Особенности
гуморальных факторов иммунного ответа при остром
поствирусном риносинусите у лиц, перенесших корь»
// Российский иммунологический журнал, 2025. Т. 28,
№ 3. С. 725–730.
doi: 10.46235/1028-7221-17115-FOH

© Корнова Н.В. и соавт., 2025

Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

N.V. Kornova, O.A. Gizinger, A.R. Gaziev, K.S. Zyrianova,
A.S. Beloshangin "Features of humoral immune response
in acute post-viral rhinosinusitis in former measles patients",
Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii
Zhurnal, 2025, Vol. 28, no. 3, pp. 725–730.
doi: 10.46235/1028-7221-17115-FOH

© Kornova N.V. et al., 2025

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

DOI: 10.46235/1028-7221-17115-FOH

ление молекул и воспалительного процесса полости носа околоносовых пазух. Частым осложнением парамиксовирусной инфекции является острый риносинусит, патогномичными показателями которого является иммунологический дисбаланс, проявляющийся усилением выработки провоспалительных цитокинов и снижение иммуноглобулинов G, A и sIgA.

Ключевые слова: корь, риносинусит, иммунитет, антитела, лимфоциты

FEATURES OF HUMORAL IMMUNE RESPONSE IN ACUTE POST-VIRAL RHINOSINUSITIS IN FORMER MEASLES PATIENTS

Kornova N.V.^a, Gizinger O.A.^b, Gaziev A.R.^b, Zyrianova K.S.^a, Beloshangin A.S.^a

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

^b P. Lumumba Peoples' Friendship University, Moscow, Russian Federation

Abstract. Measles, a highly contagious acute viral disease, transmitted by airborne droplets, is a leader among infectious diseases, both in terms of the incidence, and common complications affecting different organs and systems. According to WHO data of 2024, more than 17.3 million cases of measles were reported worldwide, and Russian Federation reported on more than 18,977 cases over the past year, according to Rospotrebnadzor data, and this number is continuously growing. The reported features of this disease over the winter-to-autumn epidemiological season 2024 include pronounced immune disorders and complications from the upper respiratory tract. Our aim was to assess the state of humoral immune response factors in acute post-viral rhinosinusitis in the persons who suffered measles. A prospective, open-label clinical trial was conducted. The level of measles-specific antibodies was studied by the content of IgG and IgM in blood serum of persons aged 19 to 55 years. Statistical data were collected, and the study was carried out at Hemotest LLC Laboratory, the Consulting and Diagnostic Center at the P. Lumumba Peoples' Friendship University of Russia (RUDN University, Moscow, Russia). The ELISA technique with Vector-Best test systems (Novosibirsk, Russia) were used to determine specific IgG and IdM in blood serum. The cytokine concentrations in nasal mucosa were determined using the ELISA method. In patients with acute post-measles rhinosinusitis, high serum concentrations of specific IgM antibodies were found in 25% of these cases, and high concentrations of IgG, in 75% of patients. In presence of acute rhinosinusitis, measles patients showed a 3.1-fold decrease in secretory IgA in nasal secretions against healthy controls, along with 2.35-fold increase in serum IL-1 β , and 3.17-fold increase in IL-6, TNF α , IL-10, and IL-8 elevation was 3.78 times, 1.96 times, and 9.15 times respectively, thus suggesting an imbalance of inflammation regulatory molecules and inflammatory process in nasal cavity and paranasal sinuses. Acute rhinosinusitis is one of the frequent complications in paramyxovirus infection. Its specific features presume an immunological imbalance, manifesting as increased production of pro-inflammatory cytokines and decrease in IgG, IgA, and sIgA.

Keywords: measles, rhinosinusitis, immunity, antibodies, lymphocytes

Введение

Корь относится к высококонтагиозным острым респираторным заболеваниям, вызываемым парамиксовирусной инфекцией. В значительной степени коревая инфекция поражает эпителиоциты верхних дыхательных путей, активируя сигнальные пути острого воспалительного ответа. Показатели заболеваемости вызванной парамиксовирусной инфекцией, в Российской Федерации продолжают оставаться высокими.

Так, по данным экспертов Роспотребнадзора, за 12 месяцев (с апреля 2023 по март 2024 года) на территории РФ зафиксировано более 18977 случаев заболевания корью. Тщательное изучение анамнеза выявило, что чаще всего заболевали преимущественно непривитые люди. Эпидемиологические данные, полученные в РФ, согласуются с выводами экспертов ВОЗ, которые считают, что показатели заболеваемости корью за истекший год стали самыми высокими, начиная

с 2006 года [1, 14]. Особенности вируса кори является то, что при инфицировании человека вирус кори, как указывалось выше, действует на рецепторы эпителиоцитов дыхательных путей, проявляет лимфотропную и нейротропную активность. Взаимодействие вируса кори и эпителиоцитов дыхательных путей приводит к включению ряда иммунных клеточных и гуморальных механизмов врожденного и адаптивного иммунитета. Нарушение иммунных взаимодействий приводит к возникновению осложнений [3, 4]. Исследования, проведенные в Москве (2023), выявили, что более чем в 38,7% случаях заболевшие корью имели осложнения в виде острых и обострения хронических заболеваний верхних дыхательных путей (ВДП) [1]. Одним из осложнений ВДП у лиц, переболевших корью, является острый риносинусит (ОРС), который не только ухудшает общее состояние пациента, но и значительно повышает риск неблагоприятного исхода реабилитационного периода [5, 6]. Высокий процент заболеваемости ОРС связан с высокой способностью к адсорбции вируса кори на эпителиоцитах дыхательных путей, что приводит к патологическим изменениям слизистых оболочек полости носа и околоносовых пазух (ОНП) [13]. Повреждение мерцательного эпителия и развившийся отек слизистых оболочек полости носа и носовых раковин приводит к блокированию естественных соустьев ОНП, нарушению их вентиляции, естественного кондиционирования и задержке эвакуации назального секрета [7, 8, 9]. Приобретение хронических, продуктивных форм воспаления при длительном течении ОРС приводит к патологическому ремоделированию слизистых оболочек ОНП, повышая риск формирования полипозного или опухолевого процесса [10, 11]. В этом контексте одним из важнейших поствирусных иммунологических изменений в организме человека, связанных с цитопатическим действием вируса кори, является воспалительный процесс, происходящий в ответ на инвазию вирусных агентов в клетки эпителия слизистых оболочек полости носа и ОНП. В патогенезе поствирусных патологических изменений со стороны гуморальных факторов особую роль играют выполняющие провоспалительные цитокины — интерлейкины IL-1, IL-6, IL-8, особенностью которых является стимуляция пролиферации и созревания Т- и В-лимфоцитов, привлечение лейкоцитов в очаг воспаления из «маргинального» пула и продукция белков острой фазы воспалительной реакции [15]. Цитокины, такие как интерлейкины (IL) и фактор некроза опухоли (TNF), оказывают значительное влияние на развитие и течение ПВРС. Это активация воспалительного ответа: при вирусной инфекции

Т-лимфоциты начинают выделять цитокины, которые усиливают воспаление, привлекая новые клетки иммунной системы [2, 12]. Понимание этого механизма имеет важное значение, так как чрезмерная продукция этих молекул может привести к повреждению тканей. IL-6 и IL-8 усиливают симптомы, включая заложенность носа, головные боли и ощущение давления в области пазух. Эти симптомы вызваны утечкой жидкости в ткани и увеличением сосудистой проницаемости [13, 15]. Противовоспалительные цитокины, такие как IL-10, помогают снижать воспалительную реакцию. Однако в ряде случаев этот баланс оказывается нарушенным, что может приводить к хроническим воспалительным процессам. Фактор некроза опухоли альфа (TNF α) является важным медиатором, способствующим воспалению и активирующим другие цитокины [2, 15]. Повышение уровня TNF α наблюдается при тяжелых формах поствирусного риносинусита. Изучение гуморальных факторов адаптивного иммунитета имеет важное значение в диагностике и выборе тактики лечения поствирусного синусита, у лиц перенесших корь.

Цель исследования — оценить состояние гуморальных факторов иммунного ответа при остром поствирусном риносинусите у лиц, перенесших корь.

Материалы и методы

Исследование является проспективным, краткосрочным, открытым. Диагноз «ОРС», у лиц перенесших корь, был выставлен по совокупности клинико-лабораторных показателей, в соответствии с законодательными актами РФ. Уровень коревых антител изучен по содержанию IgG и IgM в сыворотке крови у лиц от 19 до 55 лет. Сбор и анализ статистических данных, а также проведение исследований было осуществлено в ООО «Лаборатория Гемотест», государственный регистрационный № 1027709005642, Консультационно-диагностическом центре Российского университета дружбы народов имени Патриса Лумумбы (РУДН), Москва, Россия. Для определения специфических IgG, IgM в сыворотке крови использован метод ИФА и тест-системы АО «Вектор-Бест» (г. Новосибирск, Россия). Определение концентрации цитокинов в отделяемом со слизистой оболочки полости носа проведено с применением метода ИФА. В рамках данного исследования оценивались полученные результаты специфических IgM. Проводился анализ положительных по IgM-антителам переболевших пациентов. Оценка серопозитивности сывороток проводилась согласно инструкции производителя. Определение концентрации ци-

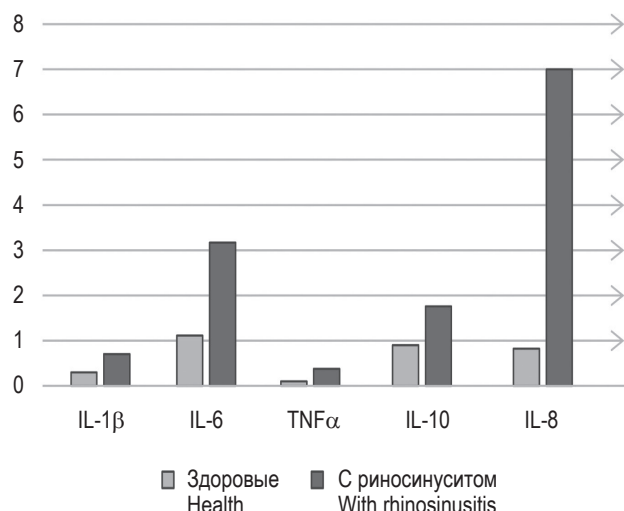


Рисунок 1. Содержание цитокинов в сыворотке крови (пг/мл) у пациентов с острым риносинуситом, перенесших корь

Figure 1. Cytokine content in blood serum (pg/mL) in patients with acute rhinosinusitis after measles

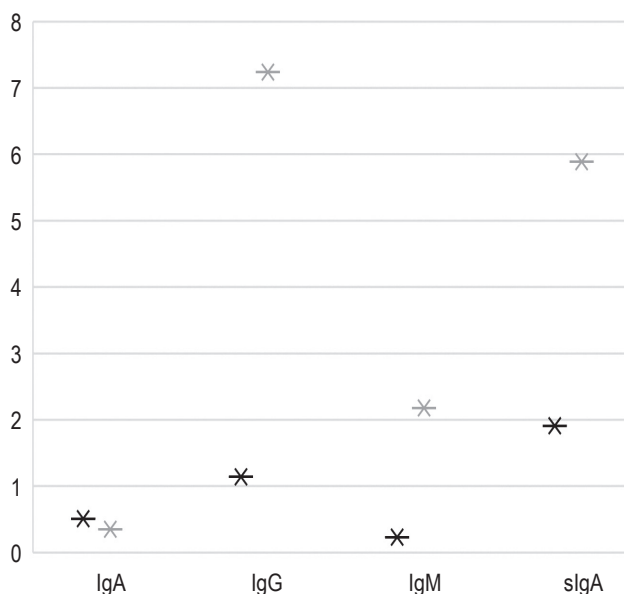


Рисунок 2. Содержание иммуноглобулинов в сыворотке крови (пг/мл) у пациентов с острым риносинуситом, перенесших корь

Figure 2. Serum immunoglobulin content (pg/mL) in patients with acute rhinosinusitis after measles

токинов, иммуноглобулинов IgM, IgG и sIgA, IgA в сыворотке крови было проведено с применением тест-систем НПО «Вектор» (г. Новосибирск, Россия). «IgA, sIgA секреторный-ИФА-БЕСТ», «IgA-ИФА-БЕСТ» (г. Новосибирск, Россия). В качестве контрольных использованы показатели здоровых людей в возрасте от 19 до 55 лет, вакцинированных от кори в соответствии с На-

циональной программой вакцинации, принятой в РФ, имеющих достаточный титр защитных антител.

Результаты и обсуждение

У пациентов с ОРС, перенесших корь, в сыворотке крови выявлен высокий уровень цитокинов, которые выполняют функцию основных иммунорегуляторных медиаторов развития воспалительной реакции, острофазового и иммунного ответа организма. Зарегистрировано повышение в сыворотке крови IL-1β в 2,35 раза с 0,31 пг/мл до 0,75 пг/мл, IL-6 в 3,17 раза с 1,11 пг/мл до 3,17 пг/мл, TNFα в 3,78 раза с 0,1 пг/мл до 0,378 пг/мл, повышение IL-10 в 1,96 раза с 0,9 пг/мл до 1,764 пг/мл, IL-8 в 9,15 раза с 0,82 пг/мл до 7,5 пг/мл, что свидетельствует о дисбалансе регулирующих воспаление молекул и остром хроническом воспалительном процессе в полости носа околоносовых пазухах (рис. 1).

Наиболее значительные изменения в содержании цитокинов были выявлены по IL-8, количество которого у больных с острым риносинуситом, резко возрастало. По содержанию иммуноглобулинов в сыворотке крови зарегистрированы достоверные изменения. На фоне острого риносинусита выявлено снижение секреторного IgA в 3,1 раза в назальном секрете относительно показателей здоровых людей. У пациентов с вирусным риносинуситом уровень секреторного IgA -1,91±0,23 г/л у здоровых 5,89±,56 г/л. Особого внимания заслуживает изменение содержания IgA и sIgA. Выявлено снижение содержания IgA в сыворотке крови с 1,45 раза с 0,51±,17 г/л у здоровых до 0,35±0,11 г/л и статистически значимое нарушение продукции sIgA с 5,89±0,34 г/л до 1,91±0,09 г/л у пациентов с риносинуситом, что может быть следствием нарушения проницаемости слизистой оболочки полости носа и околоносовых пазух и результатом активной продукции антител в ответ на антигенную стимуляцию лимфоидных структур верхних дыхательных путей под влиянием вирусных агентов, усиливающейся при воспалительном процессе (рис. 2).

Выводы

У пациентов, перенесших корь с высокой частотой, наблюдаются осложнения в виде острого риносинусита. При проведении иммунологического исследования сыворотки крови пациентов с острым риносинуситом, перенесших корь, выявлен дисбаланс иммуноглобулинов в сыворотке крови, с усилением выработки провоспалительных цитокинов и снижением иммуноглобулинов G, A и sIgA.

Список литературы / References

1. Гуров А.В., Юшкина М.А., Мужичкова А.В. Поствирусный риносинусит, фокус на патогенетическую терапию // Вестник оториноларингологии, 2023. Т. 88, № 3. С. 38-43. [Gurov A.V., Yushkina M.A., Muzhichkova A.V. Post-viral rhinosinusitis, focus on pathogenetic therapy. *Vestnik otorinolaringologii = Bulletin of Otorhinolaryngology*, 2023, Vol. 88, no. 3, pp. 38-43. (In Russ.)]
2. Дубинец И.Д., Синицкий А.И., Коркмазов М.Ю., Черных Е.И., Кухтик С.Ю. Окислительная модификация белков ткани височной кости при хронических средних отитах // Казанский медицинский журнал, 2019. Т. 100, № 2. С. 226-231. [Dubinets I.D., Sinitsky A.I., Korkmazov M.Yu., Chernykh E.I., Kuhtik S.Yu. Oxidative modification of temporal bone tissue proteins in chronic otitis media. *Kazanskiy meditsinskiy zhurnal = Kazan Medical Journal*, 2019, Vol. 100, no. 2, pp. 226-231. (In Russ.)]
3. Коркмазов М.Ю., Корнова Н.В., Ленгина М.А., Смирнов А.А., Коркмазов А.М., Дубинец И.Д. Эффективная антибактериальная терапия внебольничной оториноларингологической респираторной инфекции (клиническое описание) // Медицинский совет, 2022. № 20. С. 73-81. [Korkmazov M.Yu., Kornova N.V., Lengina M.A., Smirnov A.A., Korkmazov A.M., Dubinets I.D. Effective antibiotic therapy for community-acquired otorhinolaryngological respiratory infection (clinical description). *Meditsinskiy sovet = Medical Council*, 2022, no. 20, pp. 73-81. (In Russ.)]
4. Коркмазов М.Ю., Ленгина М.А., Коркмазов А.М., Кравченко А.Ю. Влияние постковидного синдрома на качество жизни пациентов с аллергическим ринитом и эозинофильным фенотипом хронического полипозного риносинусита // Российский медицинский журнал, 2023. Т. 29, № 4. С. 277-290. [Korkmazov M.Yu., Lengina M.A., Korkmazov A.M., Kravchenko A.Y. Effect of post-COVID syndrome on the quality of life of patients with allergic rhinitis and eosinophilic phenotype of chronic polyposis rhinosinusitis. *Rossiyskiy meditsinskiy zhurnal = Medical Journal of the Russian Federation*, 2023, Vol. 29, no. 4, pp. 277-290. (In Russ.)]
5. Коркмазов М.Ю., Зырянова К.С., Белошангин А.С. Оценка клинической эффективности фитотерапевтического лекарственного препарата в лечении и профилактике рецидивов острых риносинуситов у детей г. Челябинска // Медицинский совет, 2016. № 7. С. 90-93. [Korkmazov M.Yu., Zyryanova K.S., Beloshangin A.S. Evaluation of the clinical efficacy of a phytotherapeutic drug in the treatment and prevention of recurring acute rhinosinusitis in children of Chelyabinsk. *Meditsinskiy sovet = Medical Council*, 2016, no. 7, pp. 90-93. (In Russ.)]
6. Коркмазов М.Ю. Биорезонанс. Основные принципы биорезонансной и электромагнитной терапии // Вестник оториноларингологии, 2008. № 2. С. 59-61. [Korkmazov M.Yu. Bioresonance. Main principles of bioresonance and electromagnetic therapy. *Vestnik otorinolaringologii = Bulletin of Otorhinolaryngology*, 2008, no. 2, pp. 59-61. (In Russ.)]
7. Коркмазов М.Ю., Ленгина М.А., Коркмазов А.М., Корнова Н.В., Белошангин А.С. Лечение и профилактика различных форм ларингита на фоне острых респираторных инфекций // Медицинский совет, 2022. Т. 16, № 8. С. 79-87. [Korkmazov M.Yu., Lengina M.A., Korkmazov A.M., Kornova N.V., Beloshangin A.S. Treatment and prevention of various forms of laryngitis on the background of acute respiratory infections. *Meditsinskiy sovet = Medical Council*, 2022, Vol. 16, no. 8, pp. 79-87. (In Russ.)]
8. Коркмазов М.Ю., Ястремский А.П., Корнова Н.В., Ленгина М.А., Коркмазов А.М. Лечебно-диагностические подходы в терапии хронического тонзиллита // Медицинский совет, 2022. Т. 16, № 20. С. 90-99. [Korkmazov M.Yu., Yastremsky A.P., Kornova N.V., Lengina M.A., Korkmazov A.M. Therapeutic and diagnostic approaches in the treatment of chronic tonsillitis. *Meditsinskiy sovet = Medical Council*, 2022, Vol. 16, no. 20, pp. 90-99. (In Russ.)]
9. Коркмазов М.Ю., Крюков А.И., Дубинец И.Д., Тюхайз М.В., Учаев А.А., Маркелов А.В. Классификация структурных изменений костной ткани при хроническом гнойном среднем отите // Вестник оториноларингологии, 2019. Т. 84, № 1. С. 12-17. [Korkmazov M.Yu., Kryukov A.I., Dubinets I.D., Tyukhai M.V., Uchaev A.A., Markelov A.V. Classification of structural changes in bone tissue in chronic purulent otitis media. *Vestnik otorinolaringologii = Bulletin of Otorhinolaryngology*, 2019, Vol. 84, no. 1, pp. 12-17. (In Russ.)]
10. Коркмазов М.Ю., Казачков Е.Л., Ленгина М.А., Дубинец И.Д., Коркмазов А.М. Причинно-следственные факторы развития полипозного риносинусита // Российская ринология, 2023. Т. 31, № 2. С. 124-130. [Korkmazov M.Yu., Kazachkov E.L., Lengina M.A., Dubinets I.D., Korkmazov A.M. Cause-effect factors of rhinosinusitis polypa development. *Rossiyskaya rinologiya = Russian Rhinology*, 2023, Vol. 31, no. 2, pp. 124-130. (In Russ.)]
11. Коркмазов М.Ю., Ангелович М.С., Ленгина М.А., Белоусов С.Ю. Клинический случай ангиосаркомы решетчатого лабиринта и лобной пазухи, вопросы морфологической верификации диагноза // Вестник оториноларингологии, 2022. Т. 87, № 4. С. 102-106. [Korkmazov M.Yu., Angelovich M.S., Lengina M.A., Belousov S.Yu. Clinical case of angiosarcoma of ethmoidal labyrinth and frontal sinus, issues of morphological verification of diagnosis. *Vestnik otorinolaringologii = Bulletin of Otorhinolaryngology*, 2022, Vol. 87, no. 4, pp. 102-106. (In Russ.)]
12. Щетинин С.А., Гизингер О.А., Коркмазов М.Ю. Клинические проявления и дисфункции иммунного статуса у детей с хроническим аденоидитом и методы их коррекции с использованием озонотерапии // Российский иммунологический журнал, 2015. Т. 9, № 3-1. С. 255-257. [Shchetinin S.A., Gisinger O.A., Korkmazov M.Yu. Clinical manifestations and dysfunctions of the immune status in children with chronic

adenoiditis and methods of their correction using ozone therapy. *Rossiyskiy immunologicheskii zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2015, Vol. 9, no. 3-1, pp. 255-257. (In Russ.)]

13. Kirby T. Global measles cases up 20% in 2023. *Lancet Infect. Dis.*, 2025, Vol. 25, no. 1, e17. doi: 10.1016/S1473-3099(24)00827-2.

14. Montroy J., Yan C., Khan F., Forbes N., Krishnan R., Tunis M., Salvadori M.I. Post-exposure prophylaxis for the prevention of measles: A systematic review. *Vaccine*, 2025, Vol. 47, 126706. doi: 10.1016/j.vaccine.2025.126706.

15. Vittrup D.M., Charabi S., Jensen A., Stensballe L.G. A systematic review and meta-analysis of adverse events following measles-containing vaccines in infants less than 12 months of age. *Vaccine*, 2025, Vol. 47, 126687. doi: 10.1016/j.vaccine.2024.126687.

Авторы:

Корнова Н.В. — к.м.н., доцент кафедры оториноларингологии ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Челябинск, Россия

Гизингер О.А. — д.б.н., доцент, профессор ВАК кафедры иммунологии и аллергологии, Медицинский институт ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы», Москва, Россия

Газиев А.Р. — студент Медицинского института ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы», Москва, Россия

Зырянова К.С. — к.м.н., доцент кафедры оториноларингологии ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Челябинск, Россия

Белошангин А.С. — к.м.н., доцент кафедры оториноларингологии ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Челябинск, Россия

Authors:

Kornova N.V., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Otorhinolaryngology, South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

Gizinger O.A., PhD, MD (Biology), Associate Professor, Professor of Higher Attestation Commission, Department of Immunology and Allergology, Medical Institute, P. Lumumba Peoples' Friendship University, Moscow, Russian Federation

Gaziev A.R., Student, Medical Institute, P. Lumumba Peoples' Friendship University, Moscow, Russian Federation

Zyrianova K.S., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Otorhinolaryngology, South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

Beloshangin A.S., PhD (Medicine), Associate Professor Department of Otorhinolaryngology, South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

Поступила 13.03.2025

Отправлена на доработку 09.05.2025

Принята к печати 25.05.2025

Received 13.03.2025

Revision received 09.05.2025

Accepted 25.05.2025

СРАВНЕНИЕ МЕТОДОВ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КЛЕТОЧНОГО ИММУНИТЕТА К ВИРУСУ ЭПИДЕМИЧЕСКОГО ПАРОТИТА

Жердева П.Е.¹, Топтыгина А.П.^{1,2}, Семикина Е.Л.^{3,4}

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

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

³ ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

⁴ ФГАУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ (Сеченовский Университет), Москва, Россия

Резюме. Вакцинация против вируса эпидемического паротита значительно снизила, но не устранила заболеваемость этой инфекцией. Периодически происходят подъемы заболеваемости даже среди населения с высоким уровнем охвата прививками. Иммунологический статус к вирусу эпидемического паротита чаще оценивают по уровню специфических антител в сыворотке крови, однако известно, что для противовирусной защиты важнее Т-клеточный иммунитет. Цель работы — сопоставить два метода оценки клеточного иммунитета к антигенам вируса эпидемического паротита у интактных и переболевших этой инфекцией взрослых. Обследованы 20 взрослых, перенесших эпидемический паротит (группа 1) и 17 человек, не болевших и не прививавшихся от этой инфекции (группа 2). Антитела к вирусу эпидемического паротита определяли методом ИФА. Клеточный иммунитет оценивали методом ELISpot и по проценту CD8^{hi}CD107a⁺ лимфоцитов после распознавания антигенов вируса паротита. Ни у одного обследованного группы 2 не было обнаружено ни IgG-антител, ни клеточного иммунитета методом ELISpot или по проценту CD8^{hi}CD107a⁺. В группе 1 у 2 из 20 человек не обнаружили IgG-антител к вирусу эпидемического паротита, а 18 человек имели такие антитела разного уровня. Методом ELISpot у 10 человек обнаружен высокий уровень клеточного иммунитета к вирусу паротита (9,44±1,27) и еще у 10 человек выявлен низкий уровень (3,44±0,54). По экспрессии CD107a на CD8^{hi}лимфоцитах не выявлен клеточный иммунитет к вирусу паротита у 4 человек из 20, но обнаружены антитела к этому вирусу, еще у 4 человек обнаружен низкий уровень (2,35 (1,9–2,86) %), а у 12 человек — высокий уровень клеточного иммунитета к вирусу паротита (7,72–14,24) %. Рассчитан уровень cut-off = 3,76%, разделяющий со 100% чувствительностью и специфичностью высокий и низкий уровень клеточного иммунитета на антигены вируса паротита. Сравнение метода ELISpot и определения экспрессии молекул CD107a на CD8^{hi} показало отрицательную корреляцию $r = -0,81$,

Адрес для переписки:

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

Address for correspondence:

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

Образец цитирования:

П.Е. Жердева, А.П. Топтыгина, Е.Л. Семикина
«Сравнение методов определения клеточного иммунитета к вирусу эпидемического паротита»
// Российский иммунологический журнал, 2025. Т. 28, № 3. С. 731–736.
doi: 10.46235/1028-7221-17094-COM

© Жердева П.Е. и соавт., 2025
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

P.E. Zherdeva, A.P. Toptygina, E.L. Semikina “Comparison of methods for evaluation of cellular immunity to mumps virus”, Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2025, Vol. 28, no. 3, pp. 731–736.
doi: 10.46235/1028-7221-17094-COM

© Zherdeva P.E. et al., 2025
The article can be used under the Creative Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.46235/1028-7221-17094-COM

что связано, во-первых, с разными популяциями, участвующими в реакциях клеточного иммунитета, выявляемыми этими двумя методами, а во-вторых, в ELISpot оцениваются продуценты $IFN\gamma$, а по экспрессии CD107a — клетки, ответившие на распознавание антигена цитотоксической атакой. Оба метода пригодны для исследования клеточного иммунитета на антигены вирусов паротита.

Ключевые слова: эпидемический паротит, клеточный иммунитет, ELISpot, цитотоксические лимфоциты, $CD8^+$ клетки, $IFN\gamma$

COMPARISON OF METHODS FOR EVALUATION OF CELLULAR IMMUNITY TO MUMPS VIRUS

Zherdeva P.E.^a, Topygina A.P.^{a, b}, Semikina E.L.^{c, d}

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

^b Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

^c National Medical Research Center of Children's Health, Moscow, Russian Federation

^d I. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation

Abstract. Vaccination against mumps virus has sufficiently reduced, but not eliminated, the incidence of this infection. Incidence of this infection shows periodical increases, even among populations with high vaccination coverage. Immunity to the mumps virus is most often assessed by the serum level of specific antibodies, but T cell immunity is known to be more important for antiviral protection. The aim of the study was to compare two methods for assessing cellular immunity to mumps virus antigens in intact adults and those who had this infection. The study included 20 adults who had a story of mumps (Group 1) and 17 people who had not or were vaccinated against this infection (Group 2). Antibodies to the mumps virus were determined by ELISA technique. Cellular immunity was assessed by ELISpot test and by the percentage of $CD8^{hi}CD107a^+$ lymphocytes upon recognizing the mumps virus antigens. None of the subjects in group 2 were found to have IgG antibodies, or cellular immunity using the ELISpot method or the percentage of $CD8^{hi}CD107a^+$. In group 1, 2 of 20 subjects did not have IgG antibodies to the mumps virus, and 18 subjects had such antibodies at different levels. High level of cellular immunity to mumps virus in 10 subjects (9.44 ± 1.27) was detected by ELISpot, with low levels detected in other 10 subjects (3.44 ± 0.54). Cellular immune response to mumps virus based on CD107a expression on $CD8^{hi}$ lymphocytes was not detected in 4 out of 20 individuals, but antibodies to this virus were found; other 4 persons had a low level ($2.35 (1.9-2.86) \%$), and 12 subjects had a high level of cellular immunity to mumps virus ($7.72-14.24 \%$). The cut-off level of 3.76% was defined thus discerning high and low levels of cellular immunity to mumps virus antigens with 100% sensitivity and specificity. Comparison of ELISpot method and determination of CD107a expression on $CD8^{hi}$ showed a negative correlation $r = -0.81$, being mainly associated with different populations participating in cellular immune response detected by these two methods. Moreover, ELISpot evaluates $IFN\gamma$ producers, and CD107a expression detects cells that respond with a cytotoxic attack to antigen recognition. Both methods are suitable for studying cellular immunity to mumps viral antigens.

Keywords: mumps, cellular immunity, ELISpot, cytotoxic lymphocytes, $CD8^+$ cells, $IFN\gamma$

Введение

Эпидемический паротит — антропонозное вирусное инфекционное заболевание, проявляющееся лихорадкой, слабостью, потерей аппетита и отеком слюнных желез, чаще околоушных. Тропность вируса к железистой ткани может проявляться в виде поражения поджелудочной железы, а также мужских и женских половых желез, что чревато бесплодием [1]. Активная иммунизация против вируса эпидемического паротита, особенно введение двудозовой схемы (в 1 год и 6 лет), значительно снизила, но не устранила заболеваемость этой инфекцией. Периодически проис-

ходят подъемы заболеваемости даже среди населения с высоким уровнем охвата прививками [8]. Например, в США около трети случаев было зарегистрировано у детей и подростков, из них 81-94% получили не менее одной дозы вакцины против паротита [13]. Исследования, проведенные во французской армии, показали, что среди военнослужащих за 5 лет до исследования привитых 2 дозами вакцины MMR-II (корь, краснуха, паротит) только у 76% были обнаружены антитела к паротиту при 96% серопозитивных кори и 98% — к краснухе [6]. На территории Российской Федерации на фоне вакцинации заболеваемость эпи-

демическим паротитом существенно снизилась. С 2009 по 2015 заболеваемость составила менее 1 на 100 тыс. населения. В 2016–2017 гг. наблюдался подъем заболеваемости почти в 6 раз, а затем снова снижение и на фоне противоэпидемических мероприятий, связанных с COVID-19, достигал минимального уровня [5]. Уровень иммунитета к вирусу эпидемического паротита в большинстве исследований оценивают по содержанию специфических антител в сыворотке крови, однако известно, что для противовирусной защиты важнее Т-клеточный иммунитет. Полагают, что он осуществляет защиту организма от вируса даже в отсутствии антител [4]. При вакцинации трехвалентной вакциной Приорикс через 5 лет после вакцинации у всех привитых детей сохранились IgG-антитела к кори и краснухе, но у 10% детей отсутствовали IgG к эпидемическому паротиту, хотя после вакцинации антитела сформировались у всех привитых, а уровень IgG-антител у серопозитивных снизился на 17% [3]. Известно, что Т-клеточный иммунитет к вирусу паротита сохраняется дольше, чем В-клеточный [12]. Однако до сих пор нет общепринятого способа оценки клеточного иммунитета. Используют проточную цитометрию, мультиплексное определение цитокинов и ELISpot, подсчитывая количество клеток, синтезирующих IFN γ после стимуляции антигеном, однако помимо цитотоксических CD8⁺ лимфоцитов этот цитокин синтезируют Th1, NK-, NKT- и $\gamma\delta$ T-клетки, и далеко не все из них являются цитотоксическими, что затрудняет истинную оценку клеточного иммунитета [14].

Целью работы было сопоставление двух методов оценки клеточного иммунитета к антигенами вируса эпидемического паротита у интактных и переболевших этой инфекцией взрослых.

Материалы и методы

В простом открытом сравнительном исследовании были обследованы 37 взрослых в возрасте 20–70 лет. Согласно данным анамнеза 20 человек перенесли заболевание эпидемическим паротитом и составили группу 1, тогда как 17 человек не болели эпидемическим паротитом и не прививались от него и составили группу сравнения 2. Биологический материал получали из локтевой вены натошак в вакуумные пробирки с гепарином (4 мл) и с активатором свертывания и гелем (4 мл) для получения сыворотки. Исследование одобрено локальным этическим комитетом ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского (протокол № 69 от 12.03.2024), обследованные подписывали информированное согласие.

Для получения сыворотки крови позволяли свернуться и центрифугировали при 3500 об/мин, 6 мин. Сыворотку разливали по пробиркам типа Эппендорф, замораживали и

хранили при -30 °С. Антитела к вирусу эпидемического паротита определяли методом ИФА на наборе «ВектоПаротит-IgG» (АО «Вектор-Бест», г. Новосибирск, Россия), согласно инструкции производителя. Результаты выражали в коэффициентах позитивности (КП). Результат, превышающий 1,1 КП, расценивали как положительный.

Выделение мононуклеаров из крови осуществляли методом градиентного центрифугирования на градиенте плотности фиколл-верографин, $\rho = 1,077$ (ООО «ПанЭко», Россия), после отмывки добавляли 1 мл среды RPMI-1640 с добавками (2 mM L-глутамин, гентамицин и 10% эмбриональной телячьей сыворотки). Т-клеточный иммунитет определяли двумя разными способами.

Первый способ (оценка клеточного иммунитета методом ELISpot): клетки контрольной пробы в количестве $2,5 \times 10^5$ вносили в лунку 96-луночного планшета набора для определения IFN γ методом ELISpot (Human IFN γ ELISpot, Mabtech, Швеция) и инкубировали при 37 °С во влажной атмосфере и 5% CO₂ 20 часов. Для стимуляции антигеном вируса эпидемического паротита клетки в той же концентрации вносили в предварительно простерилизованную с помощью 30-минутного ультрафиолетового облучения лунку панели от набора для определения IgG-антител методом ИФА, на дне которой сорбированы антигены вируса эпидемического паротита. Был использован набор «ВектоПаротит-IgG» (АО «Вектор-Бест», г. Новосибирск). Клетки инкубировали при 37 °С во влажной атмосфере и 5% CO₂ 4 часа. Ранее было показано, что этого времени достаточно для того, чтобы моноциты собрали антиген. Затем клетки ресуспендировали и переносили в лунки от набора для ELISpot и инкубировали еще 16 часов при тех же условиях. После этого жидкость из лунок удаляли и промывали 5 раз забуференным фосфатами физиологическим раствором (ЗФР) по 200 мкл на лунку. Конъюгат из набора разводили в бессывороточной среде RPMI-1640, вносили по 100 мкл на лунку и инкубировали при комнатной температуре 2 часа и повторно отмывали 5 раз ЗФР. ТМБ-субстрат из набора вносили по 100 мкл на лунку и инкубировали в темноте при комнатной температуре до появления видимых пятен. Содержимое лунок удаляли, промывали 2 раза деионизированной водой, затем проточной водой, затем снимали поддон и промывали мембрану с обратной стороны. Высушивали на фильтровальной бумаге в темноте при комнатной температуре. Подсчет результатов осуществляли с помощью ELISpot-ридера (AID GmbH, Германия). Встроенная в прибор программа позволяет автоматически посчитать количество пятен в каждой лунке, а также определить суммарную площадь и интенсивность окраски пятен и пересчитать в концентрацию IFN γ в каждой лунке. Результаты

выражали как отношение количества пятен или концентрации $IFN\gamma$ в опытной лунке к соответствующему результату в контрольной лунке.

Второй способ: для контрольной пробы клетки в количестве $2,5 \times 10^5$ вносили в лунку стерильного 96-луночного планшета с добавлением раствора моненсина в конечной концентрации 10 мкМ и моноклональных антител к антигену CD107a-PE-Cy5 в конечном разведении 1:100. Стимуляцию клеток антигеном вируса эпидемического паротита осуществляли так же как описано в способе 1. Контрольную и опытную пробы инкубировали при 37 °С во влажной атмосфере и 5% CO_2 20 часов. Затем клетки ресуспендировали, переносили в пробирки для цитометрии и окрашивали антителами к антигену CD8-FITC 20 минут в темноте при 4 °С, отмывали центрифугированием (300 g 5 мин) в растворе CellWash и подвергали фенотипированию с помощью проточного цитометра BD FACS Canto II (технологии и программное обеспечение Becton Dickinson, США). В процессе анализа выделяли лимфоидный гейт, в нем в режиме FITC-SSS выделяли гейт лимфоцитов высоко экспрессирующих антиген CD8 ($CD8^{hi}$) — это субпопуляция цитотоксических Т-лимфоцитов. Далее на графике CD107a-PE-Cy5 против CD8-FITC подсчитывали процент дважды положительных клеток. Это число отражает процент цитотоксических Т-лимфоцитов, специфически распознавших антигены вируса эпидемического паротита.

Результаты экспериментов были исследованы на нормальность распределения по методу Колмогорова–Смирнова. Для параметров, удовлетворяющих критерию нормальности распределения, результаты представлены в виде средней арифметической и ее ошибки ($M \pm SE$).

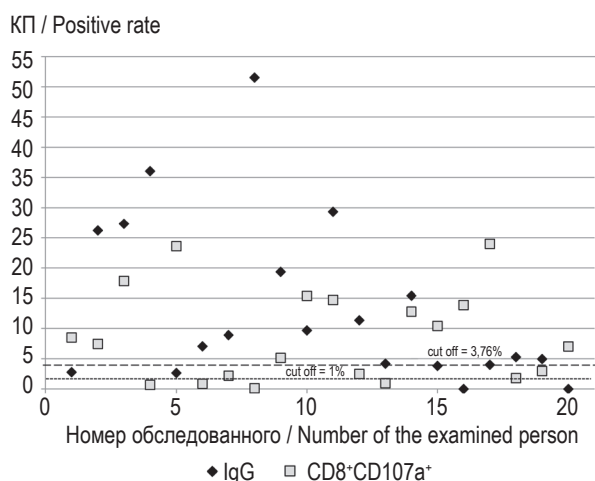


Рисунок 1. Сопоставление гуморального и клеточного иммунитета к антигенам вируса эпидемического паротита у переболевших

Figure 1. Comparison of humoral and cellular immunity to the mumps virus antigens in reconvalescents

Для параметров, не подчиняющихся нормальному распределению, результаты представлены в виде медианы, верхнего и нижнего квартилей ($Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})$). Уровень $p < 0,05$ считали значимым. Корреляцию оценивали методом Пирсона.

Результаты и обсуждение

На первом этапе у всех 37 взрослых групп 1 и 2 были исследованы сыворотки крови на наличие IgG-антител к антигенам вируса эпидемического паротита. В группе 2 все 17 человек оказались серонегативными. В группе 1 у 2 из 20 человек (10%) не обнаружили IgG-антител к антигенам вируса эпидемического паротита, а 18 человек имели такие антитела разного уровня. При определении клеточного иммунитета методом ELISpot ни у одного человека из группы 2 не обнаружено иммунного ответа на антигены вируса эпидемического паротита. В группе 1 у всех 20 человек был выявлен иммунный ответ на антигены эпидемического паротита разного уровня. Результат оценивали как отношение параметра в опытной лунке к контрольной. Программное обеспечение прибора для подсчета результатов ELISpot позволяет не только подсчитать количество пятен/клеток-продуцентов $IFN\gamma$, но также рассчитать уровень продукции этого цитокина, исходя их суммарной площади пятен и интенсивности окраски. У большинства испытуемых относительный уровень количества пятен и концентрации $IFN\gamma$ практически совпадал, но у 2 человек уровень $IFN\gamma$ был существенно выше, чем количество пятен 16,2/7,74 и 22,8/8,36 соответственно. Это связано с тем, что пятна у этих людей были крупные и интенсивно окрашенные, поэтому суммарный уровень $IFN\gamma$ был очень высокий. Этот факт свидетельствует о том, что следует учитывать оба параметра: и количество продуцентов, и суммарный уровень продукции $IFN\gamma$. По количеству клеток-продуцентов $IFN\gamma$ обследованные были разделены на 2 подгруппы: с высоким уровнем клеточного ответа ($9,44 \pm 1,27$, 10 чел.) и низким уровнем ($3,44 \pm 0,54$, 10 чел.). При оценке клеточного иммунитета к вирусу эпидемического паротита по экспрессии CD107a на $CD8^{hi}$ лимфоцитах в группе 2 также не было выявлено иммунного ответа на исследованный антиген. В группе 1 клеточный ответ на антигены вируса эпидемического паротита практически отсутствовал (не превышал уровень cut-off = 1%) у 4 человек из 20 (20%), при этом у двоих из них был выявлен максимально высокий уровень, у одного — средний и еще у одного — низкий уровень IgG-антител к вирусу эпидемического паротита. У остальных обследованных людей был обнаружен клеточный ответ разного уровня (рис. 1). С помощью ROC-анализа был рассчитан уровень cut-off = 3,76%, разделяющий со 100%-ной чувствительностью

и специфичностью высокий и низкий уровень клеточного ответа на антигены вируса паротита. При этом у 12 человек (60%) был идентифицирован высокий уровень Т-клеточного иммунного ответа (13,34 (7,72-14,24) %), а у 4 (20%) — низкий (2,35 (1,9-2,86) %). У двух человек группы 1, у которых не было выявлено IgG-антител к антигенам вируса эпидемического паротита, был обнаружен высокий клеточный ответ.

Сравнение метода ELISpot и определения экспрессии молекул CD107a на CD8^{hi} показало отрицательную корреляцию $r = -0,81$. У 4 обследованных оба метода выявили высокий клеточный ответ, у 2 людей — оба метода показали низкий ответ, при этом у 6 человек ELISpot обнаружил высокий, а по экспрессии CD107a — низкий ответ, тогда как у 8, наоборот, CD107a выявил высокий уровень, а ELISpot — низкий. Это связано, во-первых, с разными популяциями, участвующими в реакциях клеточного иммунитета, выявляемыми этими двумя методами. ELISpot — Th1, CD8⁺, NK-, NKT- и $\gamma\delta$ T-клетки, а по экспрессии CD107a — только CD8⁺ лимфоциты. А, во-вторых, в ELISpot оцениваются продуценты IFN γ , а по экспрессии CD107a — клетки, ответившие на распознавание антигена цитотоксической атакой. Не все CD8⁺ продуценты IFN γ участвуют в цитотоксической атаке и наоборот.

Хотя абсолютного иммунного коррелята защиты от эпидемического паротита не существует, уровень нейтрализующих антител считается показателем защиты, однако выявлено постепенное истощение уровня поствакцинальных антител [9]. На этом фоне клеточные иммунные реакции могут оказаться важными для предотвращения заболевания. Было показано, что Т- и В-клеточные ответы формируются и сохраняются независимо друг от друга [2]. Разные группы авторов использовали различные подходы для оценки клеточного иммунитета, но из-за методических особенностей и различий в формировании обследованных групп сложно

сопоставлять такие результаты. Так, исследовали клеточный иммунитет методом ELISpot [10], однако использовали для стимуляции живой вирус паротита, который обладает цитопатическим действием, что затрудняет оценку результатов. Также оценивали клеточный иммунитет по уровню CD107a на цитотоксических лимфоцитах, но стимуляцию проводили в цельной крови с последующим лизированием, что приводило к неспецифической сорбции антигена на форменных элементах крови и последующей неспецифической стимуляции дегрануляции, а в результате опытная проба почти не отличалась от контрольной [11]. Предполагают, что Т-клеточные иммунные ответы, сформированные в результате вакцинации, уступают в эффективности постинфекционным, однако из-за малого количества обследованных такие различия могут быть результатом межличностных особенностей иммунной системы обследуемых [7]. Тем не менее изучение клеточных иммунных ответов на антигены вируса эпидемического паротита остается актуальной темой для исследования.

Заключение

По результатам нашей работы можно заключить, что оба изученных нами метода пригодны для исследования клеточного иммунитета на антигены вирусов паротита. Рассчитанный уровень cut-off (3,76%) позволяет разделять высокий и низкий ответ цитотоксических CD8⁺ лимфоцитов на антигены вируса паротита. Отрицательная корреляция между результатами, полученными данными методами, свидетельствует о том, что они выявляют разные субпопуляции, участвующие в клеточном ответе. Если ELISpot выявляет продуцентов IFN γ , то метод оценки субпопуляций CD8^{hi}CD107a⁺ определяет именно цитотоксические CD8⁺ лимфоциты, распознающие антигены вируса паротита. А именно они и осуществляют защитную функцию Т-клеточного иммунитета.

Список литературы / References

1. Агафонов А.П., Пьянков С.А., Рябчикова Е. И., Агафонова О.А., Иванова Л.К., Козловский Л.И., Гинько З.И., Дутов В.Н., Демина О.К., Лосев М.В., Нечаева Е.А., Нетесов С.В., Сергеев А.Н., Дроздов И.Г. Эпидемический паротит. Современные представления о возбудителе, клиника, диагностика, профилактика / Под ред. А.П. Агафонов. Новосибирск: Медикобиологический Союз, 2007. 82 с. [Agafonov A.P., Pyankov S.A., Ryabchikova E.I., Agafonova O.A., Ivanova L.K., Kozlovsky L.I., Ginko Z.I., Dutov V.N., Demina O.K., Losev M.V., Nechaeva E.A., Netesov S.V., Sergeev A.N., Drozdov I.G. Mumps. Modern ideas about the pathogen, clinical picture, diagnosis, prevention. Ed. A.P. Agafonov]. Novosibirsk: Medikobiologicheskii Soyuz, 2007. 82 p.
2. Смердова М.А., Топтыгина А.П., Андреев Ю.Ю., Сенникова С.В., Зеткин А.Ю., Клыкова Т.Г., Беляков С.И. Гуморальный и клеточный иммунитет к антигенам вирусов кори и краснухи у здоровых людей // Инфекция и иммунитет, 2019. Т. 9, № 3-4. С. 607-611. [Smerdova M.A., Toptygina A.P., Andreev Yu.Yu., Sennikova S.V., Zetkin A.Yu., Klykova T.G., Belyakov S.I. Humoral and cellular immunity to measles and rubella virus antigens in healthy subjects. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2019, Vol. 9, no. 3-4, pp. 607-611. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-2019-3-4-607-611.

3. Топтыгина А.П., Алешкин В.А. Сопоставление первичного и вторичного гуморального иммунного ответа на вакцинацию «Приорикс» // *Инфекция и иммунитет*, 2013. Т. 3, № 4. С. 359-364. [Toptygina A.P., Alioshkin V.A. Comparison of the primary and secondary humoral immune response to vaccination by "Priorix". *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2013, Vol. 3, no. 4, pp. 359-364. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-2013-4-359-364.
4. Топтыгина А.П., Семикина Е.Л., Алешкин В.А. Формирование и поддержание специфического клеточного иммунного ответа на вакцинацию Приорикс // *Иммунология*, 2013. Т. 34, № 5. С. 257-261. [Toptygina A.P., Semikina E.L., Alioshkin V.A. The shaping and the maintenance of T-cell specific immune response to vaccination Priorix. *Immunologiya = Immunology*, 2013, Vol. 34, no. 5, pp. 257-261. (In Russ.)]
5. Тураева Н.В., Фролов Р.А., Цвиркун О.В., Герасимова А.Г. Характеристика эпидемиологической ситуации по эпидемическому паротиту в мире на современном этапе // *Эпидемиология и Вакцинопрофилактика*, 2021. Т. 20, № 2. С. 74-82. [Turaeva N.V., Frolov R.A., Tsvirkun O.V., Gerasimova A.G. Characteristics of the epidemiological situation of mumps in the world at the present stage. *Epidemiologiya i vaktsinoprofilaktika = Epidemiology and Vaccinal Prevention*, 2021, Vol. 20, no. 2, pp. 74-82. (In Russ.)]
6. De Laval F., Haus R., Spiegel A., Simon F. Lower long-term immunogenicity of mumps component after MMR vaccine. *Pediatr. Infect. Dis. J.*, 2010, Vol. 29, no. 11, pp. 1062-1063.
7. de Wit J., Emmelot M.E., Poelen M.C.M., van Binnendijk R.S., van der Lee S., van Baarle D., Han W.G.H., van Els C., Kaaijk P. Mumps infection but not childhood vaccination induces persistent polyfunctional CD8 T-cell memory. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2018, Vol. 141, pp. 1908-1911.
8. Fields V.S., Safi H., Waters C., Dillaha J., Capelle L., Riklon S., Wheeler J.G., Haselow D.T. Mumps in a highly vaccinated Marshallese community in Arkansas, USA: an outbreak report. *Lancet Infect. Dis.*, 2019, Vol. 19, no. 2, pp. 185-192.
9. Gouma S., Ten Hulscher H.I., Schurink-van't Klooster T.M., de Melker H.E., Boland G.J., Kaaijk P., van Els C.A.C.M., Koopmans M.P.G., van Binnendijk R.S. Mumps-specific cross-neutralization by MMR vaccine-induced antibodies predicts protection against mumps virus infection. *Vaccine*, 2016, Vol. 34, pp. 4166-4171.
10. Han W.G., Emmelot M.E., Jaadar H., Ten Hulscher H.I., van Els C.A., Kaaijk P. Development of an IFN- γ ELISPOT for the analysis of the human T cell response against mumps virus. *J. Immunol. Methods*, 2016, Vol. 431, pp. 52-59.
11. Keshavarz M., Shafiee A., Hossein M., Khosravani P., Yousefi A., Izad M. Immune response to the mumps virus in iranian unvaccinated young adults. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 2017, Vol. 70, no. 2, pp. 127-131.
12. Rubin S., Kennedy R., Poland G., Emerging Mumps Infection. *Pediatr. Infect. Dis. J.*, 2016, Vol. 35, no. 7, pp. 799-801.
13. Shepersky L., Marin M., Zhang J., Pham H., Marlow M.A. Mumps in vaccinated children and adolescents: 2007-2019. *Pediatrics*, 2021, Vol. 148, no. 6, e2021051873. doi: 10.1542/peds.2021-051873.
14. Wang L., Haralambieva I.H., Ovsyannikova I.G., Grill D.E., Warner N.D., Poland G.A., Kennedy R.B. Associations of adaptive immune cell subsets with measles, mumps, and Rubella— Specific immune response outcomes. *Heliyon*, 2023, Vol. 9, e22998. doi: 10.1016/j.heliyon.2023.e22998.

Авторы:

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

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

Семикина Е.Л. — д.м.н., главный научный сотрудник, заведующая лабораторным отделом ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения РФ; профессор кафедры педиатрии и детской ревматологии педиатрического факультета ФГАУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ (Сеченовский Университет), Москва, Россия

Authors:

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

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

Semikina E.L., PhD, MD (Medicine), Chief Researcher, Head, Laboratory Department, National Medical Research Center of Children's Health; Professor, Department of Pediatrics and Pediatric Rheumatology, Pediatric Faculty, I. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation

АУТОАНТИТЕЛА К ЛИМФОЦИТАМ И ИХ СВЯЗЬ С КОЛИЧЕСТВОМ CD4 Т-ЛИМФОЦИТОВ ПРИ ВИЧ-ИНФЕКЦИИ

Снигирев А.Я.¹, Храмова Т.В.^{1,2}, Меньшиков И.В.^{1,2}

¹ ФГБОУ ВО «Удмуртский государственный университет», г. Ижевск, Удмуртская Республика, Россия

² ФГБУН «Удмуртский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук», г. Ижевск, Удмуртская Республика, Россия

Резюме. Накопленные знания о патогенезе ВИЧ-инфекции свидетельствуют о том, что цитопатическое действие вируса на CD4 Т-лимфоциты – не единственная причина их гибели. Многочисленные данные указывают на то, что аутоантитела и цитотоксические лимфоциты, специфичные к CD4, являются фактором гибели незараженных вирусом CD4 Т-лимфоцитов и играют ведущую роль в прогрессировании иммунодефицита при ВИЧ-инфекции. Целью данной работы было исследование аутоиммунных реакций к CD4 Т-лимфоцитам у ВИЧ-инфицированных больных. Исследование проводилось на базе БУЗ УР «Удмуртский Республиканский центр по профилактике и борьбе со СПИДом и инфекционными заболеваниями» г. Ижевск. В крови 45 ВИЧ-инфицированных больных и 26 здоровых доноров определяли уровень аллогенных или аутологичных антилимфоцитарных антител, а также количество CD4 Т-лимфоцитов методом проточной цитометрии. Для определения аллоантител оценивали связывание антител исследуемого образца плазмы с моноклеарами здорового донора, для определения аутоантител оценивали связывание антител исследуемого образца плазмы с моноклеарами того же человека. Детекцию проводили с помощью вторых антител против IgG человека, меченных ФИТЦ. Уровень антилимфоцитарных антител выражали в % лимфоцитов, связавших антитела. Антитела к аллогенным лимфоцитам обнаружены у 33% (9 из 25) ВИЧ-инфицированных людей. Количество CD4 Т-лимфоцитов в крови ВИЧ-инфицированных больных, имеющих антитела к аллогенным лимфоцитам, достоверно ниже, чем в крови ВИЧ-инфицированных, у которых данные антитела не выявлены. Мембраносвязанные аутоантитела к лимфоцитам выявлены у 2 из 20, т. е. у 10% ВИЧ-инфицированных людей. Антилимфоцитарные аутоантитела, представляющие собой совокупный пул связанных с лимфоцитами аутоантител и свободно присутствующих в плазме, были выявлены у 10 из 20 ВИЧ-инфицированных пациентов (50%). Двухфакторный дисперсионный анализ выявил, что и аутоантитела к лимфоцитам, и АРВТ оказывают влияние на количество CD4 Т-лимфоцитов в крови ВИЧ-инфицированных больных (two-way ANOVA, $p = 0,045$ и $p = 0,050$ соответственно). Таким образом, в плазме крови ВИЧ-инфицированных больных выявлены аутоантитела к лимфоцитам, которые оказывают значимое влияние на количество CD4 Т-лимфоцитов в крови.

Адрес для переписки:

Храмова Татьяна Владимировна
ФГБОУ ВО «Удмуртский государственный
университет»
426034, Россия, Удмуртская Республика,
г. Ижевск, ул. Университетская, 1.
Тел./факс: 8 (3412) 91-64-26.
E-mail: khratat@mail.ru

Address for correspondence:

Tatyana V. Khramova
Udmurt State University
1 Universitetskaya St
Izhevsk, Udmurt Republic
426034 Russian Federation
Phone/fax: +7 (3412) 91-64-26.
E-mail: khratat@mail.ru

Образец цитирования:

А.Я. Снигирев, Т.В. Храмова, И.В. Меньшиков
«Аутоантитела к лимфоцитам и их связь
с количеством CD4 Т-лимфоцитов при ВИЧ-инфекции»
// Российский иммунологический журнал, 2025. Т. 28,
№ 3. С. 737-742.
doi: 10.46235/1028-7221-17102-ATL

© Снигирев А.Я. и соавт., 2025

Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

A.Ya. Snigirev, T.V. Khramova, I.V. Menshikov
“Autoantibodies to lymphocytes and their relationship to the
number of CD4 T lymphocytes in HIV infection”, Russian
Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii
Zhurnal, 2025, Vol. 28, no. 3, pp. 737-742.
doi: 10.46235/1028-7221-17102-ATL

© Snigirev A.Ya. et al., 2025

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

DOI: 10.46235/1028-7221-17102-ATL

Для выявления антилимфоцитарных аутоантител можно использовать метод связывания плазменных антител с аутолимфоцитами с последующей детекцией антивиновыми антителами, конъюгированными с флуоресцентной меткой, методом проточной цитофлуориметрии.

Ключевые слова: CD4, аллоантитела, аутоантитела, ВИЧ, СПИД, Т-лимфоциты

AUTOANTIBODIES TO LYMPHOCYTES AND THEIR RELATIONSHIP TO THE NUMBER OF CD4 T LYMPHOCYTES IN HIV INFECTION

Snigirev A. Ya.^a, Khramova T. V.^{a, b}, Menshikov I. V.^{a, b}

^a Udmurt State University, Izhevsk, Udmurt Republic, Russian Federation

^b Udmurt Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Izhevsk, Udmurt Republic, Russian Federation

Abstract. The knowledge about on pathogenesis of HIV infection suggests that the cytopathic effect of the virus on CD4 T lymphocytes is not the only cause of their death. A lot of data indicate that autoantibodies and cytotoxic lymphocytes specific to CD4 comprise a death-causing factor for uninfected CD4 T-lymphocytes, thus playing a leading role in progression of immunodeficiency in HIV infection. The aim of this work was to study autoimmune reactions against CD4 T lymphocytes in HIV-infected patients. The study was conducted at the Udmurt Republican Center for Prevention and Control of AIDS and Infectious Diseases in Izhevsk. The levels of allogeneic and autologous anti-lymphocytic antibodies were determined in blood of 45 HIV-infected patients and 26 healthy donors, as well as CD4 T lymphocyte numbers by flow cytometry. To determine alloantibodies, we evaluated the binding of antibodies from studied plasma samples to mononuclears of healthy donors. To determine autoantibodies, their binding to autologous mononuclears was evaluated. Their detection was performed with second FITC-labeled antibodies to human IgG. The level of anti-lymphocytic antibodies was expressed as per cent of antibody-binding lymphocytes. Antibodies against allogeneic lymphocytes were found in 33% (9 out of 25) of HIV-infected persons. The number of CD4 T lymphocytes in blood of HIV-infected patients with antibodies to allogeneic lymphocytes was significantly lower than in blood samples from HIV-infected patients without these antibodies. Membrane-bound autoantibodies against lymphocytes were detected in 2 out of 20, i.e. in 10% of HIV-infected persons. Anti-lymphocytic autoantibodies, which present a cumulative pool of lymphocyte-bound autoantibodies and plasma autoantibodies, were detected in 10 out of 20 HIV-infected patients (50%). Two-factor analysis of variance revealed that both antilymphocyte antibodies and antiretroviral therapy exert an effect on the number of CD4 T lymphocytes in HIV-infected patients (two-way ANOVA, $p = 0.045$ and $p = 0.050$, respectively). Thus, autoantibodies against lymphocytes were detected in the blood plasma which significant affect the number of CD4 T-lymphocytes in blood of HIV-infected patients., A technique of plasma antibody binding to autologous lymphocytes may be applied to detect anti-lymphocytic autoantibodies, followed by their detection by flow cytometry using fluorescent labeled anti-species antibodies.

Keywords: CD4, alloantibody, autoantibody, HIV, AIDS, T lymphocytes

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (FEWS-2024-0002).

Введение

Вирусы могут индуцировать аутоиммунные заболевания [9]. Целый ряд феноменов при ВИЧ-инфекции, таких как глубокое истощение CD4 Т-лимфоцитов при малом количестве зараженных CD4 Т-лимфоцитов в крови и лим-

фоузлах, часто отсутствие связи между вирусной нагрузкой и количеством CD4 Т-лимфоцитов в крови, неотвечаемость CD4 Т-лимфоцитарного звена некоторых больных на антиретровирусную терапию позволяет предполагать, что цитопатическое действие вируса на CD4-лимфоциты – не единственный фактор их гибели [1, 6, 7, 8, 10, 11]. На самых ранних этапах изучения ВИЧ-инфекции была предложена аутоиммунная гипотеза СПИДа, объясняющая гибель незараженных

CD4 Т-лимфоцитов аутоиммунной реакцией [5]. В пользу аутоиммунной гипотезы СПИДа служат следующие факты. Свободные и мембраносвязанные IgG-аутоантитела на CD4 Т-лимфоцитах обнаруживаются у ВИЧ-инфицированных людей, в том числе в острый период, до сероконверсии [7, 8, 10]. Kuwata и соавт. на модели ВНО-инфекции у макак-резус продемонстрировали, что снижение CD4 Т-клеток ассоциировано с антителами против CD4 Т-клеток, уровень которых коррелирует со степенью истощения CD4 Т-клеток [6]. Высокий уровень анти-CD4 антител коррелирует с замедленным восстановлением количества CD4 Т-клеток у иммунологических нереспондеров (лиц, имеющих низкий уровень CD4 Т-клеток, несмотря на продолжительную АРВТ) [7]. Показано, что поверхностно-связанные, а также свободные аутоантитела к CD4 Т-клеткам, ассоциированы с индукцией апоптоза CD4 Т-клеток у ВИЧ-инфицированных пациентов [7, 8].

Т-клеточный ответ против CD4 также обнаруживается у ВИЧ+ людей. Abulafia-Lapid и соавт. сообщают, что 80% ВИЧ-инфицированных пациентов имеют пролиферативный ответ Т-клеток на CD4 *in vitro* [1]. Yamatuna и соавт. показали наличие анти-CD4 цитотоксической активности у ВИЧ-инфицированных людей, направленной не только на инфицированные, но и на незараженные вирусом CD4 Т-лимфоциты [11].

Механизм индукции аутореактивных анти-CD4-лимфоцитов при ВИЧ-инфекции также был выявлен. Анти-CD4 лимфоциты активируются через идиотип-антиидиотипические взаимодействия с лимфоцитами против CD4-связывающего домена gp120 ВИЧ [3, 4, 5].

Несмотря на то, что аутоиммунная гипотеза СПИДа обоснована многими фактами, она не является общепринятой. Причинами являются частое отсутствие специфичности рекомбинантных CD4-белков к ассоциированным с ВИЧ-инфекцией аутоантителам против CD4, что в случае использования данных белков для детекции аутоантител может приводить к ложным выводам об отсутствии аутоиммунной реакции к CD4, а также отсутствие простых и надежных методов изучения клеточных аутоиммунных реакций против CD4 у больных. Кроме того, ассоциация между аутоантителами к CD4 и количеством CD4-лимфоцитов в крови может не выявляться в связи с тем, что антитела не самостоятельно, а при участии кофакторов (лигандов молекул активации), реализуют цитопатическое действие в отношении CD4-клеток.

Целью работы было исследование аутоиммунных реакций к CD4 Т-лимфоцитам у ВИЧ-инфицированных пациентов. В качестве антиге-

нов для выявления антител были апробированы аллогенные лимфоциты здоровых доноров и собственные аутологичные лимфоциты.

Материалы и методы

Исследование проводилось на базе БУЗ УР «Удмуртский республиканский центр по профилактике и борьбе со СПИДом и инфекционными заболеваниями» (г. Ижевск, Россия). Были изучены образцы крови 45 ВИЧ-инфицированных больных и 26 здоровых доноров. У всех участников исследования были взяты письменные информированные согласия.

Для детекции антилимфоцитарных антител в плазме ВИЧ-инфицированных больных были использованы аллолимфоциты, полученные от здоровых доноров, и аутолимфоциты. К суспензии мононуклеаров, выделенных из крови центрифугированием в градиенте плотности, добавляли 500 мкл исследуемой плазмы, разведенной в 10 раз. В плазме предварительно инактивировали комплемент. Инкубировали 30 мин при комнатной температуре. К отмытым трижды в 3ФР мононуклеарам добавляли антитела мыши против IgG человека, меченные ФИТЦ (ООО «ИМТЕК», Россия). Инкубировали 30 мин при комнатной температуре. С помощью проточного цитометра подсчитывали процент Ig⁺ клеток среди 10 000 лимфоцитов.

Количество CD4Т-лимфоцитов в крови ВИЧ-инфицированных больных определяли с помощью готовых к работе наборов (BeckmanCoulter, США) на проточном цитометре EPICSXL4-MCL (Beckman Coulter, США).

Статистический анализ результатов проводили с помощью программы GraphPad Prism 8.4, различия считали значимыми при $p \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение

Антитела к аллогенным лимфоцитам были исследованы в образцах плазмы 25 ВИЧ-инфицированных пациентов (64% из них находились на АРВТ по схеме 1 ряда EFV + 3ТС + TDF), а также 15 здоровых лиц. Уровень антител к аллогенным лимфоцитам выражали в % лимфоцитов, связавших антитела из исследуемого образца плазмы. За пороговое значение, выше которого плазму считали положительной на антитела к лимфоцитам, было принято значение уровня антител к аллогенным лимфоцитам, рассчитанное как среднее значение лимфоцитов здоровых доноров, связавших аллогенные антитела из образцов плазмы здоровых доноров, ± 3 SD. Оно составило 18,8% лимфоцитов (рис. 1А).

Антитела к аллогенным лимфоцитам были найдены у 33% ВИЧ-инфицированных людей

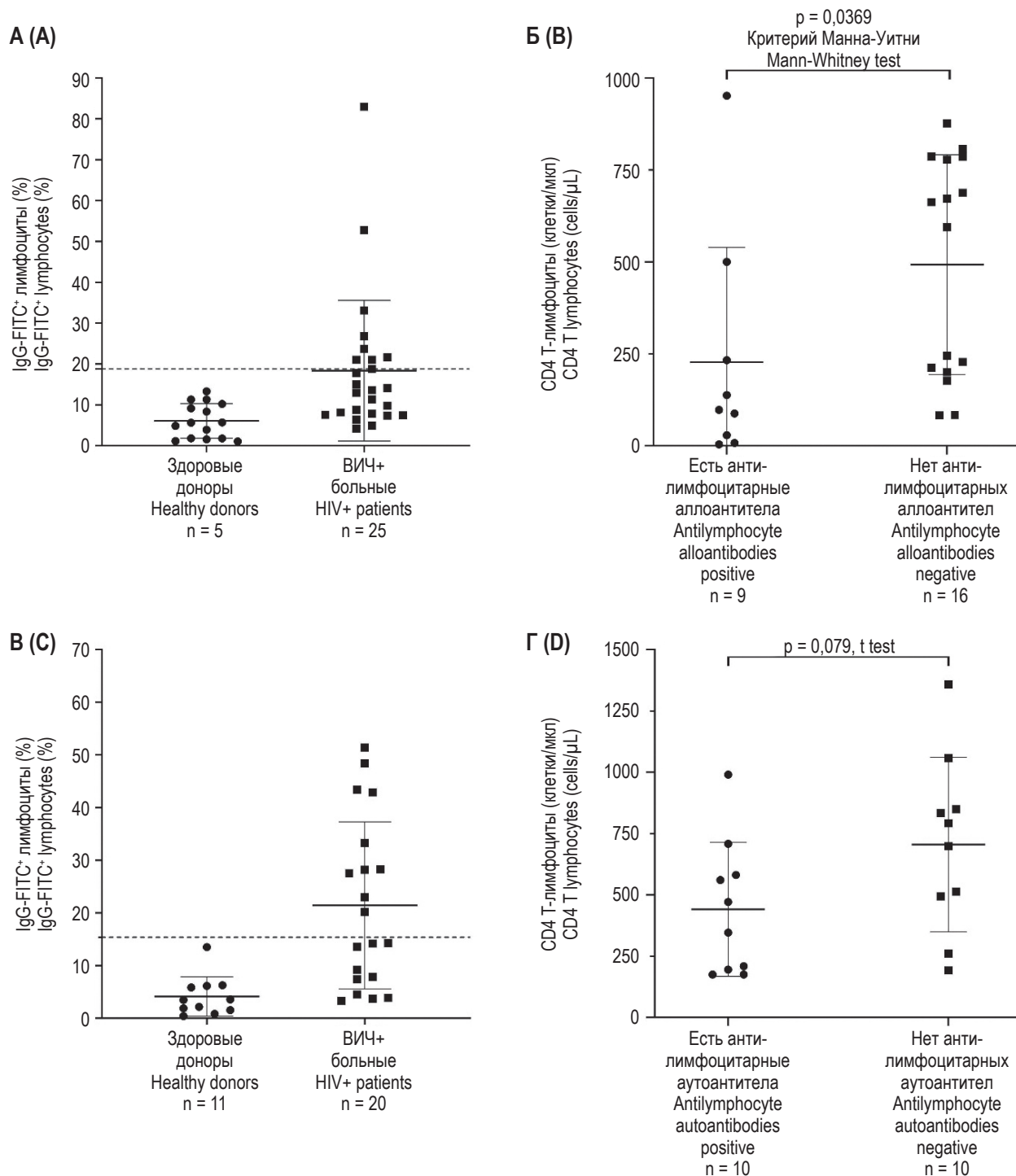


Рисунок 1. А – антилимфоцитарные аллоантитела. Б – число CD4 T-лимфоцитов у ВИЧ-инфицированных больных, имеющих и не имеющих антитела к аллогенным лимфоцитам в плазме крови. В – пул мембраносвязанных и свободных антилимфоцитарных аутоантител. Г – число CD4 T-лимфоцитов в крови ВИЧ-инфицированных больных, имеющих и не имеющих антилимфоцитарные аутоантитела

Примечание. Представлены индивидуальные значения. Пунктирной линией обозначено пороговое значение, выше которого плазма крови считалась содержащей антитела.

Figure 1. A, anti-lymphocytic alloantibodies. B, the number of CD4 T lymphocytes in HIV-infected patients positive and negative for antibodies to allogeneic lymphocytes in blood plasma. C, a pool of membrane-bound and soluble anti-lymphocytic autoantibodies. D, the number of CD4 T lymphocytes in the blood of HIV-infected patients positive and negative for anti-lymphocytic autoantibodies. Note. Individual values are presented. The dotted line indicates the threshold value above which the blood plasma was considered to contain antibodies.

(рис. 1А). Сравнительный анализ количества CD4 Т-лимфоцитов в крови ВИЧ-инфицированных, имеющих антитела к аллогенным лимфоцитам и не имеющих таковых, показал, что количество CD4 Т-лимфоцитов в крови ВИЧ-инфицированных, имеющих антитела к аллогенным лимфоцитам, достоверно ниже, чем в крови ВИЧ-инфицированных, у которых данные антитела не выявлены (рис. 1Б).

Аутоантитела против лимфоцитов, мембраносвязанные и свободные, были изучены у 20 ВИЧ-инфицированных пациентов (45% из них находились на АРВТ по схеме 1-го ряда EFV+3ТС+TDF) и 11 здоровых людей. Уровень мембраносвязанных аутоантител к лимфоцитам выражали в % лимфоцитов, несущих поверхностные аутоантитела класса G. Пороговое значение, выше которого образец считали положительным на мембраносвязанные аутоантитела, составило 12,8% лимфоцитов. Мембраносвязанные антилимфоцитарные аутоантитела выявлены у 10% ВИЧ-инфицированных людей.

У тех же 20 ВИЧ-инфицированных пациентов и 11 здоровых людей были исследованы антилимфоцитарные аутоантитела, представляющие собой совокупный пул свободных (плазменных) и мембраносвязанных аутоантител. Пороговое значение для пула аутоантител к лимфоцитам составило 15,4% лимфоцитов (рис. 1В). Антилимфоцитарные аутоантитела были выявлены у 50% ВИЧ-инфицированных (рис. 1В). Следовательно, большая часть аутоантител к лимфоцитам находится в плазме крови в свободном виде.

Количество CD4 Т-лимфоцитов у ВИЧ-инфицированных, имеющих антилимфоцитарные аутоантитела, оказалось ниже, чем у ВИЧ-инфицированных, не имеющих данных аутоантител (рис. 1Г). Однако различие количества CD4 Т-клеток не было значимым: $p = 0,079$, t test (рис. 1Г). Известно, что антиретровирусная терапия обычно эффективна у большинства пациентов и позволяет восстанавливать и поддерживать количество CD4 Т-лимфоцитов [2]. Чтобы оценить влияние этих двух факторов (АРВТ и аутоантител) на количество CD4 Т-лимфоцитов был применен двухфакторный дисперсионный анализ (two-way analysis of variance, ANOVA). ВИЧ-позитивные пациенты были поделены на четыре группы: пациенты, не принимающие АРВТ и имеющие антилимфоцитарные аутоантитела (АРВТ-, аутоАт+), пациенты, не принимающие АРВТ и не имеющие антилимфоцитарных аутоантител (АРВТ-, аутоАт-), пациенты, принимающие АРВТ и имеющие антилимфоцитарные аутоантитела (АРВТ+, аутоАт+), пациенты, принимающие АРВТ и не имеющие антилимфоцитарных аутоантител (АРВТ+, аутоАт-). Наимень-

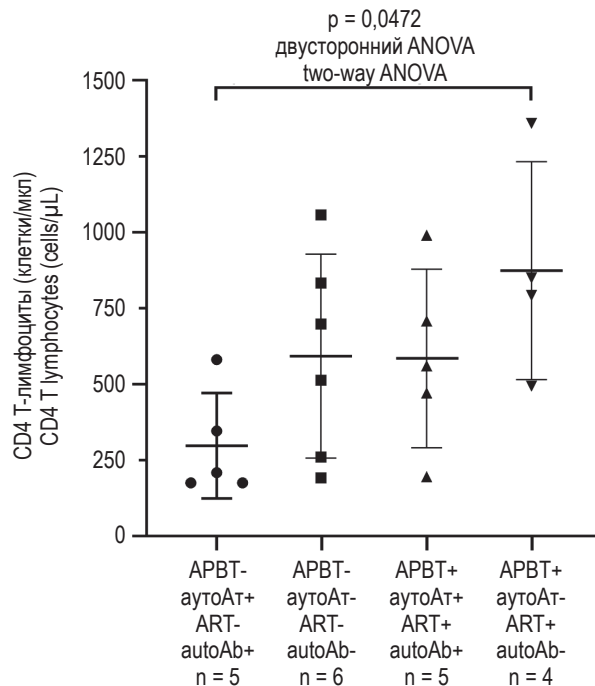


Рисунок 2. Число CD4 Т-лимфоцитов в крови ВИЧ-инфицированных больных, принимающих и не принимающих АРВТ, имеющих и не имеющих антилимфоцитарные аутоантитела в плазме крови

Примечание. Представлены индивидуальные значения.

Figure 2. The number of CD4 T lymphocytes in the blood of HIV-infected patients taking and not taking ART, positive and negative for anti-lymphocytic autoantibodies in blood plasma
Note. Individual values are presented.

шее число CD4 Т-клеток наблюдалось у больных, имеющих антилимфоцитарные аутоантитела и не принимающих АРВТ, а наибольшее количество CD4 Т-лимфоцитов в крови у людей, находящихся на АРВТ и не имеющих антилимфоцитарные аутоантитела (рис. 2). Различия между этими группами значимы ($p = 0,047$, two-way ANOVA). Двухфакторный дисперсионный анализ выявил, что и аутоантитела к лимфоцитам и АРВТ оказывают значимое влияние на количество CD4 Т-лимфоцитов в крови ($p = 0,045$ и $p = 0,050$ соответственно, two-way ANOVA).

Закключение

В плазме крови ВИЧ-инфицированных выявлены аутоантитела к лимфоцитам, и они оказывают значимое влияние на количество CD4 Т-лимфоцитов в крови. Для выявления антилимфоцитарных аутоантител, ассоциированных с ВИЧ-инфекцией и оказывающих влияние на уровень CD4-лимфоцитов, можно использовать метод связывания антител с аутолимфоцитами с последующей детекцией антивидовыми антителами методом проточной цитофлуориметрии.

Список литературы / References

1. Abulafia-Lapid R., Keren-Zur Y., Yachnin Y., Atlan H. Major CD4 epitopes involved in anti-CD4 T-cell autoimmunity in HIV-1 patients. *Vaccine*, 2007, Vol. 25, no. 16, pp. 3192-3199.
2. Battegay M., Nuesch R., Hirschel B., Kaufmann G.R. Immunological recovery and antiretroviral therapy in HIV-1 infection. *Lancet Infect. Dis.*, 2006, Vol. 6, no. 5, pp. 280-287.
3. Corre J.P., Fevrier M., Chamaret S., Theze J., Zouali M. Anti-idiotypic antibodies to human anti-gp120 antibodies bind recombinant and cellular human CD4. *Eur. J. Immunol.*, 1991, Vol. 21, no. 3, pp. 743-751.
4. Keay S., Tacket C., Murphy J.R., Handwerker B.S. Anti-CD4 anti-idiotypic antibodies in volunteers immunized with rgp 160 of HIV-1 or infected with HIV-1. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, 1992, Vol. 8, no. 6, pp. 1091-1098.
5. Kennedy J.R. AIDS – an autoimmune model. *Med. Hypotheses*, 1992, Vol. 37, no. 1, pp. 16-19.
6. Kuwata T., Nishimura Y., Whitted S., Ourmanov I., Brown C.R., Dang Q., Buckler-White A., Iyengar R., Brechley J.M., Hirsch V.M. Association of progressive CD4(+) T cell decline in SIV infection with the induction of autoreactive antibodies. *PLoS Pathog.*, 2009, Vol. 5, no. 4, e1000372. doi: 10.1371/journal.ppat.1000372.
7. Luo Z., Li Z., Martin L., Wan Z., Meissner E.G., Espinosa E., Wu H., Yu X., Fu P., Westerink M.A.J., Kilby J.M., Wu J., Huang L., Heath S.L., Li Z., Jiang W.J. Pathological role of anti-CD4 antibodies in HIV-infected immunologic nonresponders receiving virus-suppressive antiretroviral therapy. *Infect. Dis.*, 2017, Vol. 216, no. 1, pp. 82-91.
8. Luo Z., Zhou Z., Ogunrinde E., Zhang T., Li Z., Martin L., Wan Z., Wu H., Qin Z., Ou T., Zhang J., Ma L., Liao G., Heath S., Huang L., Jiang W. The effect of plasma auto-IgGs on CD4(+) T cell apoptosis and recovery in HIV-infected patients under antiretroviral therapy. *J. Leukoc. Biol.*, 2017, Vol. 102, no. 6, pp. 1481-1486.
9. Shoenfeld Y., Agmon-Levin N., Rose N. Infection and autoimmunity. Amsterdam: Elsevier Science, 2004. 768 p.
10. Song A., Li Z., Luo Z., Lu X., Wang R., Liu L., Xia W., Wan Z., Zhang T., Su B., Jiang W., Wu H. Effects of early and delayed antiretroviral therapy on plasma anti-CD4 autoreactive IgG and its association with CD4+ T-cell recovery in acute HIV-infected individuals. *Front. Pharmacol.*, 2020, Vol. 11, 449. doi: 10.3389/fphar.2020.00449.
11. Yamamura Y., Rodriguez N., Schwartz A., Eylar E., Yano N. Anti-CD4 cytotoxic T lymphocyte (CTL) activity in HIV+ patients: flow cytometric analysis. *Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-grand)*, 1995, Vol. 41, Suppl. 1, pp. 133-144.

Авторы:

Снигирев А.Я. — аспирант кафедры иммунологии и клеточной биологии ФГБОУ ВО «Удмуртский государственный университет», г. Ижевск, Удмуртская Республика, Россия

Храмова Т.В. — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории молекулярной и клеточной иммунологии ФГБОУ ВО «Удмуртский государственный университет»; старший научный сотрудник лаборатории биосовместимых материалов ФГБН «Удмуртский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук», г. Ижевск, Удмуртская Республика, Россия

Меньшиков И.В. — д.б.н., профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной и клеточной иммунологии ФГБОУ ВО «Удмуртский государственный университет»; главный научный сотрудник лаборатории биосовместимых материалов ФГБН «Удмуртский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук», г. Ижевск, Удмуртская Республика, Россия

Authors:

Snigirev A. Ya., Postgraduate Student, Department of Immunology and Cell Biology, Udmurt State University, Izhevsk, Udmurt Republic, Russian Federation

Khramova T. V., PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratory of Molecular and Cell Immunology, Udmurt State University; Senior Researcher, Laboratory of Biocompatible Materials, Udmurt Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Izhevsk, Udmurt Republic, Russian Federation

Menshikov I. V., PhD, MD (Biology), Professor, Leading Researcher, Laboratory of Molecular and Cell Immunology, Udmurt State University; Chief Researcher, Laboratory of Biocompatible Materials, Udmurt Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Izhevsk, Udmurt Republic, Russian Federation

Поступила 03.03.2025
Принята к печати 01.05.2025

Received 03.03.2025
Accepted 01.05.2025

CCR6⁺CXCR3⁺CD8⁺T-ЛИМФОЦИТЫ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ В ПАТОГЕНЕЗЕ РЕЦИДИВИРУЮЩЕ-РЕМИТТИРУЮЩЕГО РАССЕЯННОГО СКЛЕРОЗА

**Лебедев В.М.¹, Фролова О.М.¹, Старикова Э.А.², Маммедова Дж.Т.²,
Кудрявцев И.В.²**

¹ ФГБУН «Институт мозга человека имени Н.П. Бехтеревой» Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия

² ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Рассеянный склероз (РС) — это хроническое прогрессирующее нейродегенеративное аутоиммунное заболевание нервной системы, которое характеризуется появлением в головном и спинном мозге диссеминированных очагов демиелинизации, в составе которых обнаруживаются различные популяции иммунных клеток, включая CD8⁺T-лимфоциты. В настоящее время общий пул CD8⁺T-клеток принято разделять на три ключевых подтипа — Tc1, Tc2 и Tc17, которые принимают участие в реализации воспалительных реакций по трем ключевым типам и различаются по своим функциональным, а также фенотипическим характеристикам. Баланс между цитолитическими Tc1, с одной стороны, и «цитокин-продуцирующими» Tc2 и Tc17, с другой, играет важную роль в развитии различных патологических состояний, включая аутоиммунные заболевания. Целью исследования был анализ субпопуляционного состава CD8⁺T-клеток периферической крови у 25 пациентов с рецидивирующе-ремиттирующим течением РС и 24 условно здоровых добровольцев, соответствующих по полу и возрасту группе РС. Для выявления основных субпопуляций CD8⁺T-клеток применяли проточную цитометрию, при помощи которой определяли относительное и абсолютное содержание Tc1 (CCR6⁺CXCR3⁺), Tc2 (CCR6⁺CXCR3⁺), Tc17 (CCR6⁺CXCR3⁺) и Tc17.1 (CCR6⁺CXCR3⁺) клеток, а также их распределение в рамках «наивных» клеток (CD45RA⁺CD62L⁺), клеток центральной (СМ) и эффекторной (ЕМ) памяти (с фенотипами CD45RA⁺CD62L⁺ и CD45RA⁺CD62L⁺ соответственно), а также эффекторных клеток популяции TEMRA (CD45RA⁺CD62L⁺). Было показано, что при РС в периферической крови достоверно снижалось относительно содержание Tc1-клеток,

Адрес для переписки:

Кудрявцев Игорь Владимирович
ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»
197376, Россия, Санкт-Петербург, ул. Академика
Павлова, 12.
Тел.: 8 (812) 234-16-69.
E-mail: igorek1981@yandex.ru

Address for correspondence:

Igor V. Kudryavtsev
Institute of Experimental Medicine
12 Acad. Pavlov St
St. Petersburg
197376 Russian Federation
Phone: +7 (812) 234-16-69.
E-mail: igorek1981@yandex.ru

Образец цитирования:

В.М. Лебедев, О.М. Фролова, Э.А. Старикова,
Дж.Т. Маммедова, И.В. Кудрявцев «CCR6⁺CXCR3⁺
CD8⁺T-лимфоциты периферической крови в патогенезе
рецидивирующе-ремиттирующего рассеянного
склероза» // Российский иммунологический журнал,
2025. Т. 28, № 3. С. 743–750.
doi: 10.46235/1028-7221-17141-PBC

© Лебедев В.М. и соавт., 2025

Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

V.M. Lebedev, O.M. Frolova, E.A. Starikova,
J.T. Mammedova, I.V. Kudryavtsev “Peripheral blood
CCR6⁺CXCR3⁺CD8⁺T cells in pathogenesis of relapsing-
remitting multiple sclerosis”, Russian Journal of Immunology/
Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2025, Vol. 28, no. 3,
pp. 743–750.
doi: 10.46235/1028-7221-17141-PBC

© Lebedev V.M. et al., 2025

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

DOI: 10.46235/1028-7221-17141-PBC

а относительное и абсолютное содержание Tc17 и Tc17.1 достоверно возрастало относительно значений контрольной группы. Более того, при анализе уровня Tc17-клеток нами было отмечено достоверное увеличение их процентного содержания в рамках всех исследованных стадий созревания CD8⁺T-лимфоцитов, циркулировавших в периферической крови пациентов с РС. Причем различия с группой контроля особенно ярко проявлялись в случае популяций CD8⁺T-лимфоцитов, способных мигрировать в воспаленные ткани — EM и TEMRA (11,66% (4,75-14,69) против 2,45% (1,48-3,89) и 4,91% (3,68-8,63) против 0,41% (0,11-1,30) соответственно, при $p < 0,001$ для обеих популяций клеток). Полученные нами результаты указывают на важную роль Tc17-клеток в патогенезе РС, что может в дальнейшем применяться для разработки новых способов диагностики и терапии данного заболевания.

Ключевые слова: проточная цитометрия, рассеянный склероз, CD8⁺T-клетки, Tc17-клетки, созревание T-клеток, поляризация T-клеток

PERIPHERAL BLOOD CCR6⁺CXCR3⁻CD8⁺T CELLS IN PATHOGENESIS OF RELAPSING-REMITTING MULTIPLE SCLEROSIS

Lebedev V.M.^a, Frolova O.M.^a, Starikova E.A.^b, Mammedova J.T.^b, Kudryavtsev I.V.^b

^a N. Bechtereva Institute of the Human Brain, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russian Federation

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

Abstract. Multiple sclerosis (MS) is a chronic progressive neurodegenerative autoimmune disease characterized by disseminated demyelination patches in brain and spinal cord, containing different subsets of immune cells, including CD8⁺T cells. Currently, CD8⁺T cells may be subdivided into three main subsets, including Tc1, Tc2 and Tc17, according to their cytokine production profile and phenotype. A balance between the cytolytic Tc1 and cytokine-producing Tc2 and Tc17 cell subsets seems to play crucial role in emergence of diverse pathological conditions including autoimmunity. Thus, we have examined the frequency of Tc cell subsets in peripheral blood of patients with relapsing-remitting MS (MS, $n = 25$), and healthy individuals (HC, $n = 24$) matched for sex and age. To analyze the frequency of CD8⁺T cell subsets, we used multicolor flow cytometry. We evaluated the relative and absolute frequencies of Tc1 (CCR6⁻CXCR3⁺), Tc2 (CCR6⁻CXCR3⁻), Tc17 (CCR6⁺CXCR3⁻) and Tc17.1 (CCR6⁺CXCR3⁺) cells, like as their relative distribution along the main maturation stages of CD8⁺T cells, including “na ve” (CD45RA⁺CD62L⁺), central (CM) and effector (EM) memory, as well as TEMRA (CD45RA⁺CD62L⁻) cells. First, we have found that the relative frequency of Tc1 was decreased in MS group versus HC, whereas the relative and absolute frequencies of Tc17 of Tc17.1 were significantly elevated in MS patients. Next, our data revealed a significantly increased frequency of Tc17 cells at all analyzed stages of CD8⁺T cell maturation in peripheral blood samples from MS patients. Moreover, the differences against control group were more pronounced in the EM and TEMRA CD8⁺T cell subsets which are able to migrate to inflammation sites (11.66% (4.75-14.69) *versus* 2.45% (1.48-3.89) and 4.91% (3.68-8.63) *versus* 0.41% (0.11-1.30), respectively, $p < 0.001$ in both cases). Hence, we provide some new insights in the frequency of “polarized” CD8⁺T cell subsets in patients with MS. The obtained data suggest Tc17 cells to be an important part in MS pathogenesis which may be used for development of new diagnostic techniques and treatment approaches in MS patients.

Keywords: flow cytometry, multiply sclerosis, CD8⁺T cells, Tc17, T cell maturation, T cell polarization

Данная работа выполнена при финансовой поддержке плановой теме НИР ФГБНУ «ИЭМ» FGWG-2025-0004 (рег. № 1022041101001-1).

Введение

CD8⁺T-лимфоциты являются весьма гетерогенной группой клеток, функции которых связаны не только с индукцией апоптоза в клетках-мишенях, но и с продукцией широкого спектра иммунорегуляторных молекул при различного рода патологических процессах [1, 11]. В настоящее время общий пул CD8⁺T-клеток принято разделять три ключевых подтипа — Tc1, Tc2 и Tc17, которые принимают участие в реализации воспалительных реакций по трем ключевым типам [1]. Подобно Th1-клеткам Tc1 CD8⁺T-лимфоциты занимают ведущую роль в реализации воспалительных реакций по I типу за счет наличия выраженных цитолитических свойств, основанных на способности накапливать в цитоплазматических гранулах перфорин и гранзины, а также продукции эффекторных цитокинов IFN γ и TNF α [1]. Tc1 CD8⁺T-лимфоциты экспрессируют на своей поверхности CCR5 и CXCR3, тогда как остальные хемокиновые рецепторы, свойственные Tc2, Tc17 и фолликулярным CD8⁺T-лимфоцитам (CCR4, CCR6 и CXCR5 соответственно), на их клеточной мембране отсутствуют [6]. С другой стороны, в циркуляции также выявляют Tc2 и Tc17 CD8⁺T-клетки, которые по спектру экспрессируемых транскрипционных факторов и секретируемых цитокинов схожи с Th2 и Th17 соответственно, но не обладают выраженными способностями уничтожать клетки-мишени [8]. По-видимому, баланс между цитолитическими Tc1, с одной стороны, и «цитокин-продуцирующими» популяциями Tc2 и Tc17, с другой, играет важную роль в развитии различных патологических состояний, включая аутоиммунные заболевания [11].

Рассеянный склероз (РС) — это хроническое прогрессирующее нейродегенеративное аутоиммунное заболевание нервной системы, которое характеризуется появлением в головном и спинном мозге диссеминированных очагов демиелинизации, в составе которых обнаруживаются различные популяции иммунных клеток, включая CD8⁺T-лимфоциты [10]. Считается, что ведущую роль в запуске воспаления в нервной ткани играют Т-хелперы-1 (Th1) и Т-хелперы-17 (Th17), причем последние способны за счет синтеза и секреции IL-17 и IL-22 привлекать из кровотока различные клетки, включая нейтрофилы, и нарушать структуру плотных контактов клеток состав гемато-энцефалического барьера [2]. Как уже отмечалось выше, среди CD8⁺T-клеток так-

же присутствуют популяции лимфоцитов (Tc1 и Tc17), способные к продукции этих важных с точки зрения инициации повреждений нервных тканей цитокинов. Следует также отметить тот факт, что Tc17-клетки способны к продукции широкого спектра провоспалительных цитокинов, включая IL-5, IL-13, IL-17, IL-21, IL-22, IFN γ , TNF α и GM-CSF [6], которые играют важную роль в патогенезе РС. Однако в настоящее время обнаруживается лишь небольшое количество исследований, посвященных динамике различных субпопуляций «поляризованных» CD8⁺T-клеток при РС. Поэтому в рамках собственного исследования нами был изучен субпопуляционный состав «поляризованных» CD8⁺T-клеток, которые находились на различных стадиях созревания, у пациентов с РС.

Материалы и методы

Объектом исследования служила периферическая кровь, полученная от 25 пациентов с рецидивирующе-ремиттирующим течением РС (9 мужчин и 15 женщин; возраст 35 лет (27–41); баллы шкалы инвалидизации EDSS 2 (1,5–2,5); все пациенты не получали иммуносупрессивной терапии на момент получения образцов крови), и 24 условно здоровых добровольцев, соответствующих по полу и возрасту группе РС. Диагноз «РС» устанавливался на основании критериев МакДональда 2010 года. Исследование одобрено Комитетом по этике ФГБНУ «Институт мозга человека им. Н.П. Бехтеревой» РАН 23.10.2014 и проводилось с информированного согласия пациентов.

В рамках подготовки образцов периферической крови для проточной цитометрии применялась следующая комбинация моноклональных антител против поверхностных антигенов человека: CD45RA (клон 2H4, конъюгирован с FITC), CD62L (клон DREG56, конъюгирован с PE), CXCR5 (клон J252D4, конъюгирован с PerCP/Cy5.5), CCR6 (клон G034E3, конъюгирован с PE/Cy7), CXCR3 (клон G025H7, конъюгирован с APC), CD3 (клон OKT3, конъюгирован с APC/Cy7), CD8 (клон SK1, конъюгирован с Pacific Blue) и CCR4 (клон L291H4, конъюгирован с Brilliant Violet 510). Все антитела применялись в соответствии с рекомендациями производителя (производителем CD45RA и CD62L являлась компания Beckman Coulter, США; всех остальных антител — компания BioLegend, США). Для удаления эритроцитов использовали коммерческий буфер VersaLyse Lysing Solution (Beckman Coulter, США). По завершении разрушения эритроцитов (15 минут при комнатной температуре в темноте) образцы однократно отмывали (7 минут

при 300g) избытком забуференного фосфатами физиологического раствора (ЗФР, pH 7,2-7,4), после чего клеточный осадок ресуспендировали в 200 мкл свежего ЗФР с 2% нейтрального параформальдегида (Sigma-Aldrich, США). Сбор цитометрических данных осуществляли на проточной цитометре Navios 3/10 (Beckman Coulter, США), оснащенном программным обеспечением Navios Software 1.2 (Beckman Coulter, США). В каждом образце анализировалось не менее 30 000 CD8⁺T-клеток периферической крови. Подготовка образцов для анализа, а также «тактика гейтирования» были описаны нами ранее [4].

Обработку данных цитометрии проводили при помощи Kaluza software v2.0 (Beckman Coulter, США). Статистическую обработку осуществляли при помощи пакетов программ Statistica 8.0 (StatSoft, США) и GraphPad Prism 8 (GraphPad software, США). Результаты выражали в виде % позитивных клеток от искомой популяции или абсолютного содержания клеток в 1 мкл периферической крови (для этих целей применяли ком-

мерческие частицы для абсолютного счета Flow-Count Fluorospheres (Beckman Coulter, США) в отдельной пробе), приводили в виде медианы и интерквартильного размаха — Me ($Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$). Для оценки достоверности различий использовали непараметрический U-критерий Манна–Уитни.

Результаты и обсуждение

С применением многоцветной проточной цитометрии в рамках общего пула CD8⁺T-лимфоцитов периферической крови на основании анализа коэкспрессии хемокиновых рецепторов CXCR3 и CCR6 нами были выявлены четыре популяции клеток, в том числе Tc1 (CCR6⁺CXCR3⁺), Tc2 (CCR6⁺CXCR3[−]), Tc17 (CCR6[−]CXCR3[−]) и Tc17.1 (CCR6[−]CXCR3⁺). Было показано (рис. 1), при РС в периферической крови достоверно снижалось относительно содержание Tc1-клеток (с 71,35% (61,95–77,66) до 61,10% (54,47–64,89) при $p = 0,001$). Вместе с тем, как относительное, так и абсолютное содержа-

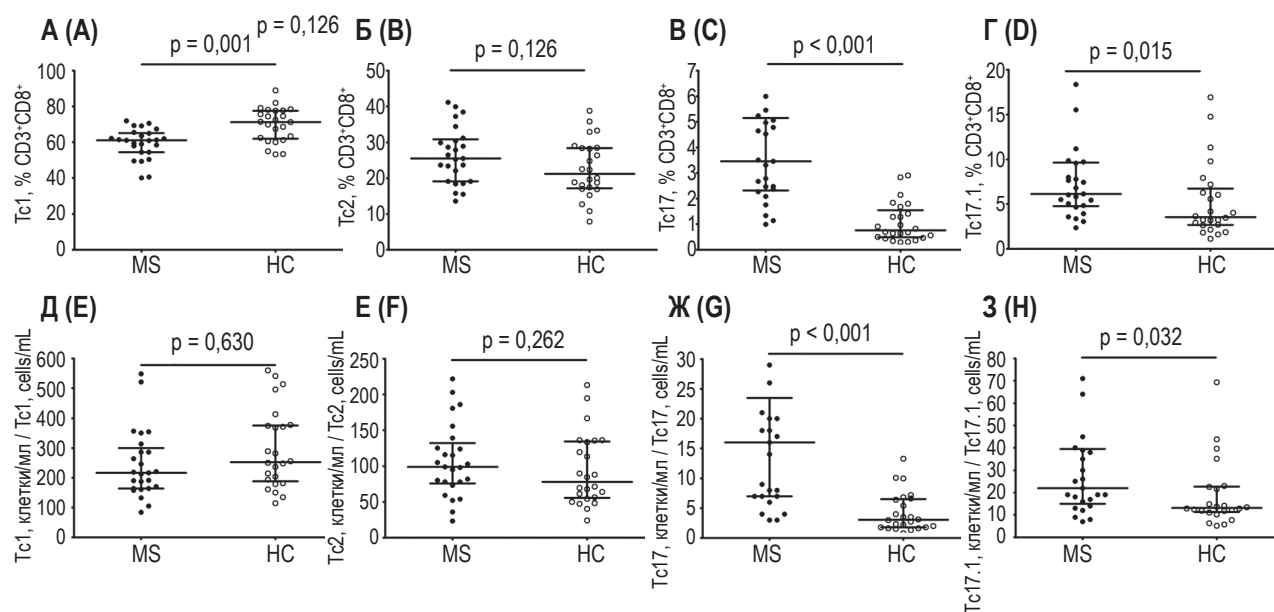


Рисунок 1. Основные субпопуляции «поляризованных» CD8⁺T-лимфоцитов периферической крови у пациентов с рассеянным склерозом

Примечание. Гистограммы А-Г – относительное содержание (% в рамках общего пула CD8⁺T-клеток), гистограммы Д-З – абсолютное содержание (количество клеток в 1 мкл цельной крови) основных «поляризованных» популяций CD8⁺T-лимфоцитов. Здесь и на рисунке 2: черным – пациенты с РС (MS, n = 25), белым – здоровый контроль (HC, n = 24). Результаты представлены в виде медианы и интерквартильного размаха — Me ($Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$). Для полученных сравнения выборок использовали непараметрический критерий Манна–Уитни.

Figure 1. Alteration in relative and absolute numbers of major 'polarized' CD8⁺T cell subsets in patients with multiple sclerosis

Note. Scatter plots (A-D) and (E-H) show the percentages (% within total CD8⁺T cell subset) and absolute numbers (number of cells per 1 μ L) Tc1, Tc2, Tc17 and Tc17.1 cells, respectively. Here and on the Figure 2: black circles denote patients with multiple sclerosis (MS, n = 25); white circles – healthy control (HC, n = 24). The data are presented as medians and quartile ranges: Me ($Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$). The statistical analysis was performed with nonparametric Mann–Whitney U test.

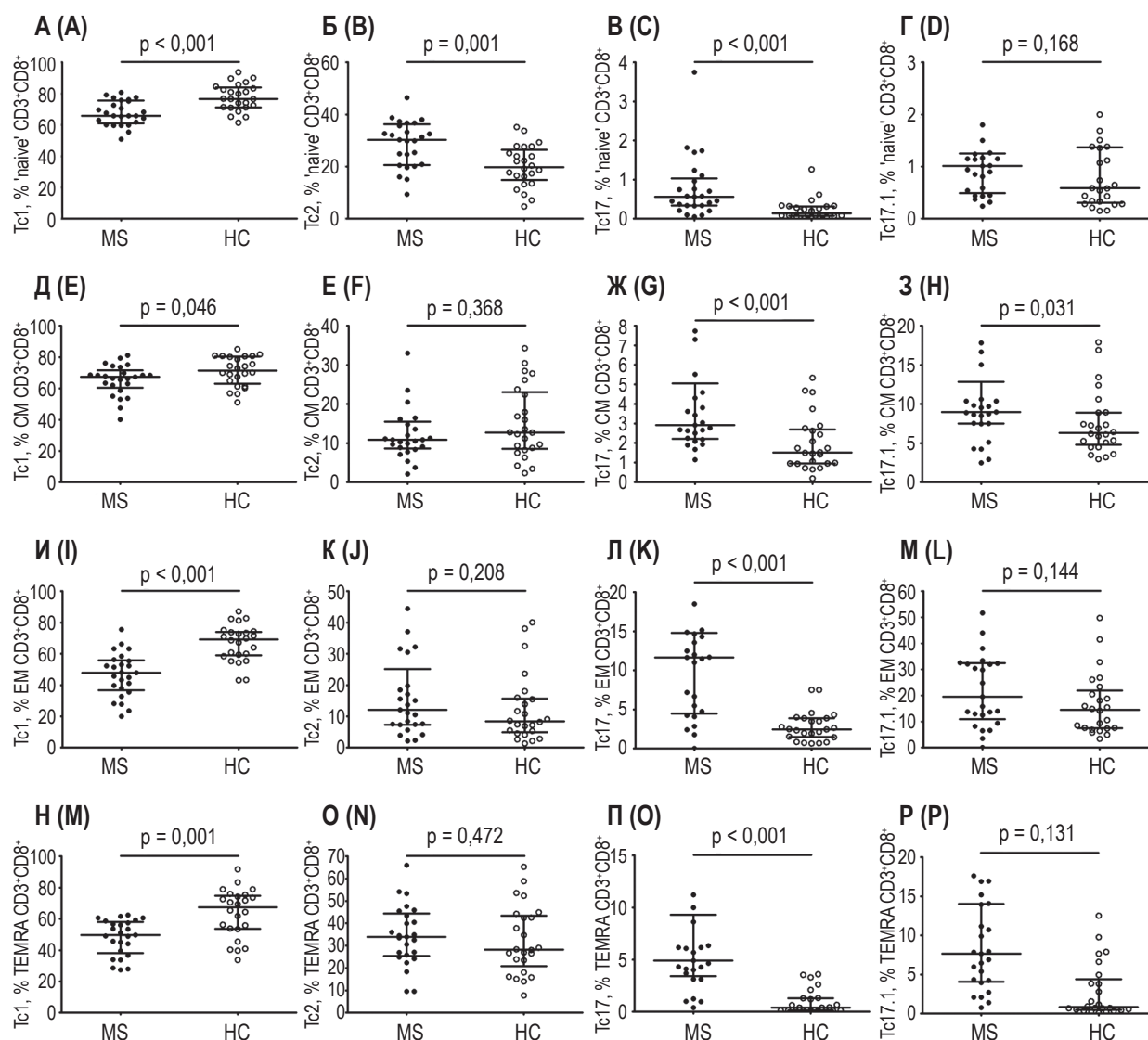


Рисунок 2. Нарушения в балансе Tc1, Tc2, Tc17 и Tc17.1-клеток в рамках субпопуляций CD8⁺-лимфоцитов периферической крови, находящихся на различных стадиях созревания, у пациентов с рассеянным склерозом
Примечание. Гистограммы А-Г, Д-З, И-М и Н-Р – относительное содержание основных «поляризованных» популяций CD8⁺-лимфоцитов Tc1 (CCR6⁺CXCR3⁺), Tc2 (CCR6⁺CXCR3⁺), Tc17 (CCR6⁺CXCR3⁺) и Tc17.1 (CCR6⁺CXCR3⁺) в рамках «наивных» клеток (CD45RA⁺CCR7⁺), клеток центральной (CM, CD45RA⁺CCR7⁺) и эффекторной памяти (EM, CD45RA⁺CCR7⁺), а также эффекторных клеток популяции TEMRA (CD45RA⁺CCR7⁺), соответственно. См. примечание к рисунку 1.

Figure 2. Imbalance in peripheral blood Tc1, Tc2, Tc17, and Tc17.1 cells in maturation CD8⁺T cell subsets in patients with multiple sclerosis

Note. Scatter plots (A-D), (E-H), (I-L), and (M-P) present the relative numbers of Tc1 (CCR6⁺CXCR3⁺), Tc2 (CCR6⁺CXCR3⁺), Tc17 (CCR6⁺CXCR3⁺), and Tc17.1 (CCR6⁺CXCR3⁺) cells, respectively, within 'naïve' (CD45RA⁺CCR7⁺), central memory (CM, CD45RA⁺CCR7⁺), effector memory (EM, CD45RA⁺CCR7⁺), and terminally differentiated CD45RA-positive effector memory (TEMRA, CD45RA⁺CCR7⁺) CD8⁺T cells, respectively. See note to Figure 1.

ние CCR6-позитивных клеток – Tc17 и Tc17.1 – достоверно возрастало относительно значений контрольной группы (в случае Tc17 с 0,76% (0,49-1,54) до 3,45% (2,36-5,06) и с 3 кл/1 μL (2-6) до 16 кл/1 μL (7-21) при p < 0,001 для обеих величин;

а в случае Tc17.1 – с 3,56% (2,68-6,73) до 6,15% (4,85-9,56) при p = 0,015 и с 13 кл/1 μL (11-23) до 22 кл/1 μL (16-39) при p = 0,032).

В ходе дальнейших исследований в рамках общего пула CD8⁺T-лимфоцитов на основании

коэкспрессии CD45RA и CD62L были выявлены четыре основные стадии созревания CD8⁺T-клеток, включая «наивные» ('naive') клетки с фенотипом CD45RA⁺CD62L⁺, клетки центральной (CM) и эффекторной (EM) памяти (с фенотипами CD45RA-CD62L⁺ и CD45RA-CD62L- соответственно), а также зрелые эффекторные клетки популяции TEMRA (*англ.* effector memory cells re-expressing CD45RA). В рамках каждой из указанных выше популяций CD8⁺T-клеток, находящихся на разных стадиях созревания, нами было определено относительное содержание Tc1-, Tc2-, Tc17- и Tc17.1-клеток, как это было описано ранее [3]. Было показано (рис. 2), что относительное содержание Tc1-клеток у пациентов с РС в периферической крови относительно значений контрольной группы (в случае «наивных» было снижено как в рамках популяций T-клеток, которые «патрулировали» периферические лимфоидные органы — «наивные» клетки и клетки центральной памяти (с 76,67% (71,28-83,92) до 65,87% (61,87-75,24) при $p < 0,001$ и с 71,42% (63,08-80,43), до 67,46% (61,99-69,69) при $p = 0,046$ соответственно), так и среди EM и TEMRA клеток, способных покидать кровотоки и мигрировать в очаги воспаления локализованные в периферических тканях (с 69,20% (58,96-74,01) до 47,89% (37,97-55,38) при $p < 0,001$ и с 67,44% (53,68-74,78) до 49,75% (39,48-57,37) при $p = 0,001$ соответственно). Относительное содержание CCR6-CXCR3-Tc2-клеток при РС повышалось только в случае CD8⁺T-клеток с фенотипом CD45RA⁺CD62L⁺ (30,28% (20,82-35,70) против 19,76% (14,81-26,40) в контроле при $p = 0,001$). При анализе уровня Tc17-клеток нами было отмечено достоверное увеличение процентного содержания данной популяции клеток на всех исследованных стадиях созревания CD8⁺T-лимфоцитов, циркулировавших в периферической крови пациентов с РС (рис. 2). Причем различия с группой контроля особенно ярко проявлялись в случае популяций CD8⁺T-лимфоцитов, способных мигрировать в воспаленные ткани — EM и TEMRA (11,66% (4,75-14,69) против 2,45% (1,48-3,89) и 4,91% (3,68-8,63) против 0,41% (0,11-1,30) соответственно, при $p < 0,001$ для обеих популяций клеток). И, наконец, при исследовании Tc17.1 лимфоцитов, нами было отмечено, что уровень этих клеток возрастал у пациентов с РС относительно значений здорового контроля только в рамках клеток центральной памяти (8,97% (7,52-10,63) против 6,31% (4,79-8,91) при $p = 0,031$).

В ходе проведенного исследования нами было отмечено увеличение уровня Tc17-клеток (как в относительных, так и в абсолютных величинах)

в периферической крови пациентов с рецидивирующе-ремиттирующим течением РС относительно контрольных значений. Следует отдельно подчеркнуть, что наиболее выраженными эти изменения были в рамках популяций EM и TEMRA CD8⁺T-клеток, способных покидать кровотоки и мигрировать в очаги воспаления, что может указывать на непосредственное участие Tc17-клеток в воспалительных реакциях, протекающих в нервной ткани. Данные литературы указывают, что CD8⁺IFN γ ⁺Tc1 и CD8⁺IL-17⁺Tc17 увеличивались в периферической крови у пациентов как с рецидивирующе-ремиттирующим течением, так и со вторично-прогрессирующим РС в фазе рецидива [12]. Возможно, что накопление этих клеток в циркуляции именно в фазе рецидива РС может свидетельствовать о важности Tc17-клеток в патогенезе рассеянного склероза. Более того, с учетом способности Tc17-клеток к продукции ключевых провоспалительных цитокинов (IL-17, IL-21, IL-22, IFN γ , TNF α и GM-CSF) [6], играющих важную роль в развитии воспалительной реакции в нервной ткани при РС, данные клетки представляют весьма перспективную мишень для терапии. Подтверждением тому является тот факт, что некоторыми авторами было отмечено увеличение уровней Tc17-клеток в спинномозговой жидкости пациентов с РС по сравнению с их периферической кровью и по сравнению с спинномозговой жидкостью контрольных пациентов [14], а также F. Lolli и соавт. также выявили положительную корреляцию между уровнями Tc17 в спинномозговой жидкости и инвалидизацией пациентов, выраженной в баллах шкалы EDSS [5], что указывает на тесную связь между Tc17 и прогрессией данного заболевания. Более того, было показано, что на фоне терапии диметилфумаратом наблюдалось снижение Tc17, но не Th17 в периферической крови у пациентов с РС, что также было подтверждено на модели экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита у мышей [7]. Также С. Lückel и соавт. выявили, что повышенные уровни Tc17-клеток в циркуляции являлся одним из факторов ответа пациентов на терапию диметилфумаратом, тогда как у пациентов с низким содержанием Tc17 применение данного препарата было малоэффективным [7].

И наконец выявленное нами увеличение количества Tc17-клеток именно в рамках EM и TEMRA популяций, способных секретировать высокие уровни цитотоксических молекул и провоспалительных цитокинов, свидетельствует в пользу активного участия CD8⁺T-клеток в патогенезе РС, что было также предсказано другими исследователями [13]. Более того, накопление

IL-17-продуцирующих и CD161⁺Tc17-клеток было свойственно для популяций активированных и эффекторных CD8⁺T-клеток крови пациентов с рецидивирующе-ремиттирующим течением РС [9].

Выводы

При РС достоверно возрастает относительное и абсолютное содержание CXCR3⁺CCR6⁺Tc17- и CXCR3⁺CCR6⁺Tc17.1-клеток в периферической

крови. У пациентов с РС относительное содержание Tc1-клеток достоверно снижается, тогда как доля Tc17 возрастает на всех стадиях дифференцировки CD8⁺T-клеток, включая «наивные» CD8⁺T-клетки, CD8⁺T-клетки центральной и эффекторной памяти, а также зрелые эффекторы популяции TEMRA. Все это указывает на важную роль Tc17-клеток в патогенезе РС, что может в дальнейшем применяться для разработки новых способов диагностики и терапии данного заболевания.

Список литературы / References

1. Annunziato F., Romagnani C., Romagnani S. The 3 major types of innate and adaptive cell-mediated effector immunity. *J. Allergy. Clin. Immunol.*, 2015, Vol. 135, no. 3, pp. 626-635.
2. Kebir H., Kreymborg K., Ifergan I., Dodelet-Devillers A., Cayrol R., Bernard M., Giuliani F., Arbour N., Becher B., Prat A. Human TH17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation. *Nat. Med.*, 2007, Vol. 13, no. 10, pp. 1173-1175.
3. Kudryavtsev I., Benevolenskaya S., Serebriakova M., Grigor'yeva I., Kuvarin E., Rubinstein A., Golovkin A., Kalinina O., Zaikova E., Lapin S., Maslyanskiy A. Circulating CD8⁺ T cell subsets in primary Sjögren's syndrome. *Biomedicines*, 2023, Vol. 11, no. 10, 2778. doi: 10.3390/biomedicines11102778.
4. Kudryavtsev I.V., Arsentieva N.A., Korobova Z.R., Isakov D.V., Rubinstein A.A., Batsunov O.K., Khamitova I.V., Kuznetsova R.N., Savin T.V., Akisheva T.V., Stanevich O.V., Lebedeva A.A., Vorobyov E.A., Vorobyova S.V., Kulikov A.N., Sharapova M.A., Pevtsov D.E., Totolian A.A. Heterogenous CD8⁺ T cell maturation and 'polarization' in acute and convalescent COVID-19 patients. *Viruses*, 2022, Vol. 14, no. 9, 1906. doi: 10.3390/v14091906.
5. Lolli F., Martini H., Citro A., Franceschini D., Portaccio E., Amato M.P., Mechelli R., Annibali V., Sidney J., Sette A., Salvetti M., Barnaba V. Increased CD8⁺ T cell responses to apoptotic T cell-associated antigens in multiple sclerosis. *J. Neuroinflammation*, 2013, Vol. 10, 94. doi: 10.1186/1742-2094-10-94.
6. Loyal L., Warth S., Jürchott K., Mölder F., Nikolaou C., Babel N., Nienen M., Durlanik S., Stark R., Kruse B., Frentsch M., Sabat R., Wolk K., Thiel A. SLAMF7 and IL-6R define distinct cytotoxic versus helper memory CD8⁺ T cells. *Nat. Commun.*, 2020, Vol. 11, 6357. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19002-6>.
7. Lückel C., Picard F., Raifer H., Campos Carrascosa L., Guralnik A., Zhang Y., Klein M., Bittner S., Steffen F., Moos S., Marini F., Gloury R., Kurschus F.C., Chao Y.Y., Bertrams W., Sexl V., Schmeck B., Bonetti L., Grusdat M., Lohoff M., Zielinski C.E., Zipp F., Kallies A., Brenner D., Berger M., Bopp T., Tackenberg B., Huber M. IL-17⁺ CD8⁺ T cell suppression by dimethyl fumarate associates with clinical response in multiple sclerosis. *Nat. Commun.*, 2019, Vol. 10, no. 1, 5722. doi: 10.1038/s41467-019-13731-z.
8. Mittrücker H.W., Visekruna A., Huber M. Heterogeneity in the differentiation and function of CD8⁺ T cells. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz)*, 2014, Vol. 62, no. 6, pp. 449-458.
9. Nicol B., Salou M., Vogel I., Garcia A., Dugast E., Morille J., Kilens S., Charpentier E., Donnart A., Nedellec S., Jacq-Foucher M., Le Frère F., Wiertlewski S., Bourreille A., Brouard S., Michel L., David L., Gourraud P.A., Degauque N., Nicot A.B., Berthelot L., Laplaud D.A. An intermediate level of CD161 expression defines a novel activated, inflammatory, and pathogenic subset of CD8⁺ T cells involved in multiple sclerosis. *J. Autoimmun.*, 2018, Vol. 88, pp. 61-74.
10. Reich D.S., Lucchinetti C.F., Calabresi P.A. Multiple Sclerosis. *N. Engl. J. Med.*, 2018, Vol. 378, no. 2, pp. 169-180.
11. Rubinstein A., Kudryavtsev I., Arsentieva N., Korobova Z.R., Isakov D., Totolian A.A. CXCR3-Expressing T Cells in Infections and Autoimmunity. *Front. Biosci. (Landmark Ed.)*, 2024, Vol. 29, no. 8, 301. doi: 10.31083/j.fbl2908301.
12. Salehi Z., Doosti R., Beheshti M., Janzamin E., Sahraian M.A., Izad M. Differential frequency of CD8⁺ T cell subsets in multiple sclerosis patients with various clinical patterns. *PLoS One*, 2016, Vol. 11, no. 7, e0159565. doi: 10.1371/journal.pone.0159565.

13. Stojić-Vukanić Z., Hadžibegović S., Nicole O., Nacka-Aleksić M., Leštarević S., Leposavić G. CD8+ T cell-mediated mechanisms contribute to the progression of neurocognitive impairment in both multiple sclerosis and Alzheimer's disease? *Front. Immunol.*, 2020, Vol. 11, 566225. doi: 10.3389/fimmu.2020.566225.
14. Wang H.H., Dai Y.Q., Qiu W., Lu Z.Q., Peng F.H., Wang Y.G., Bao J., Li Y., Hu X.Q. Interleukin-17-secreting T cells in neuromyelitis optica and multiple sclerosis during relapse. *J. Clin. Neurosci.*, 2011, Vol. 18, pp. 1313-1317.

Авторы:

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

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

Старикова Э.А. — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории клеточной иммунологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Маммедова Дж.Т. — научный сотрудник лаборатории клеточной иммунологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Кудрявцев И.В. — к.б.н., заведующий лабораторией клеточной иммунологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Authors:

Lebedev V.M., Neurologist, Head of the Neurology Department, Junior Researcher at the Laboratory of Targeted Intracerebral Drug Delivery, N. Bechtereva Institute of the Human Brain, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russian Federation

Frolova O.M., Neurologist, Junior Researcher, Laboratory of Targeted Intracerebral Drug Delivery, N. Bechtereva Institute of the Human Brain, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russian Federation

Starikova E.A., PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratory of Cellular Immunology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Mammedova J.T., Researcher, Laboratory of Cellular Immunology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Kudryavtsev I.V., PhD (Biology), Head, Laboratory of Cellular Immunology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Поступила 25.03.2025
Принята к печати 25.05.2025

Received 25.03.2025
Accepted 25.05.2025

ПОКАЗАТЕЛИ ХРОНИЧЕСКОГО СИСТЕМНОГО ВОСПАЛЕНИЯ У ПАЦИЕНТОВ С РАЗНОЙ СТЕПЕНЬЮ КОМПЕНСАЦИИ ИНСУЛИНОРЕЗИСТЕНТНОСТИ

Журавлёва Ю.А.¹, Турянская Ю.В.², Соколова Л.А.², Гусев Е.Ю.¹

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

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

Резюме. В работе представлен анализ маркеров системного воспаления у пациентов с инсулино-резистентностью, приводящей к хроническому нарушению метаболизма разной степени компенсации (декомпенсированный и компенсированный сахарный диабет 2-го типа – СД2, преддиабет). Цель исследования – проанализировать особенности продукции маркеров хронического системного воспаления у пациентов с различными стадиями инсулинорезистентности: преддиабет, компенсированный СД2 и декомпенсированный СД2. В исследование включены пациенты с гипергликемией, которые по уровню в крови глюкозы и гликированного гемоглобина были разделены на 3 группы: 26 человек – с установленным диагнозом «преддиабет», 34 пациента – с компенсированным СД2 и 29 человек – с декомпенсированным СД2. Контрольную группу составили здоровые доноры крови (n = 89). Методом иммуноферментного анализа определяли сывороточные концентрации С-реактивного белка (CRP), интерлейкинов IL-6, IL-8, IL-10, фактора некроза опухоли альфа (TNFα), D-димера, тропонина I, миоглобина, кортизола, прокальцитонина. Результаты исследования показали, что большинство маркеров системного воспаления во всех трех группах пациентов с патологической инсулинорезистентностью превышали таковые в контрольной группе. Наиболее выраженные отклонения наблюдались в отношении показателей системной воспалительной реакции (CRP, IL-6, IL-8 и TNFα) и микротромбообразования (D-димера). Повышение их продукции наблюдалось уже на стадии преддиабета и нарастало по мере прогрессирования гликемических нарушений. Повышение сывороточной концентрации РСТ при СД2 предположительно связано с транслокацией бактериальных антигенов из кишечника вследствие повреждения энтероцитов. Уровни кортизола у большинства пациентов оставались в пределах референсных значений и достоверно не отличались в зависимости от стадии инсулинорезистентности. Такая же картина наблюдалась в отношении мар-

Адрес для переписки:

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

Address for correspondence:

Yulia A. Zhuravleva
Institute of Immunology and Physiology,
Ural Branch, Russian Academy of Sciences
106 Pervomayskaya St
Ekaterinburg
620049 Russian Federation
Phone: +7 (343) 374-00-70.
E-mail: jazhur@mail.ru

Образец цитирования:

Ю.А. Журавлёва, Ю.В. Турянская, Л.А. Соколова,
Е.Ю. Гусев «Показатели хронического системного
воспаления у пациентов с разной степенью
компенсации инсулинорезистентности» // Российский
иммунологический журнал, 2025. Т. 28, № 3. С. 751–756.
doi: 10.46235/1028-7221-17108-POC

© Журавлёва Ю.А. и соавт., 2025
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

Yu.A. Zhuravleva, Yu.V. Turyanskaya, L.A. Sokolova,
E.Yu. Gusev “Parameters of chronic systemic inflammation
in patients with different compensation degree of insulin
resistance”, Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy
Immunologicheskii Zhurnal, 2025, Vol. 28, no. 3, pp. 751–756.
doi: 10.46235/1028-7221-17108-POC

© Zhuravleva Yu.A. et al., 2025
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.46235/1028-7221-17108-POC

керо́в системно́й альте́рации — миоглобина и тропонина I, что можно рассматривать как благоприятный прогностический признак. В ответ на метаболические изменения уже на ранних стадиях гипергликемии происходит системная активация провоспалительных механизмов, которая прогрессирует по мере нарастания признаков инсулинорезистентности. Наиболее значимые отклонения выявлены со стороны показателей системной воспалительной реакции и микротромбообразования.

Ключевые слова: системное воспаление, гипергликемия, сахарный диабет 2-го типа, преддиабет, системная воспалительная реакция, гиперкоагуляция

PARAMETERS OF CHRONIC SYSTEMIC INFLAMMATION IN PATIENTS WITH DIFFERENT COMPENSATION DEGREE OF INSULIN RESISTANCE

Zhuravleva Yu.A., Turyanskaya Yu.V., Sokolova L.A., Gusev E.Yu.

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

^b Ural State Medical University, Ekaterinburg, Russian Federation

Abstract. The paper presents an analysis of systemic inflammatory markers (SIM) in patients with insulin resistance classified into various compensation degrees of chronic metabolic disorders (decompensated and compensated type 2 diabetes mellitus — DM2, prediabetes). Our aim was to analyse the features of chronic SIM marker production in patients with different stages of insulin resistance, i.e., prediabetes, compensated DM2 and decompensated DM2. *Materials and Methods:* The study included patients with hyperglycemia, who were divided into 3 groups according to blood glucose and glycated hemoglobin levels (26 patients with prediabetes, 34 cases with compensated DM2 and 29 persons with decompensated DM2). The control group included healthy blood donors (n = 89). Serum concentrations of C-reactive protein (CRP), interleukins IL-6, IL-8, IL-10, tumor necrosis factor alpha (TNF α), D-dimer, troponin I, myoglobin, cortisol, and procalcitonin were determined by enzyme immunoassay. The results of the study showed that most markers of systemic inflammation in all three groups of patients with pathological insulin resistance exceeded those in the control group. The most intense variations were observed with markers of systemic inflammatory response (CRP, IL-6, IL-8 and TNF α) and microthrombosis (D-dimer). Their production elevated as soon as at the pre-diabetes stage and increased as glycemic disturbances progressed. The increased serum procalcitonin concentration in DM2 is presumably may be caused by translocation of bacterial antigens from the intestine as a result of enterocyte damage. Cortisol levels in most patients remained within reference values and did not differ significantly depending on the stage of insulin resistance. The same trend was observed for systemic alteration markers — myoglobin and troponin I, which may be considered as a good prognostic sign. In response to metabolic changes, there is a systemic activation of proinflammatory mechanisms since early stages of hyperglycemia. This disorder proceeds with increasing signs of insulin resistance. Indices of systemic inflammatory response and microthrombosis showed the most significant changes.

Keywords: systemic inflammation, hyperglycemia, type 2 diabetes mellitus, prediabetes, systemic inflammatory response, hypercoagulability

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

Введение

По данным «Федерального Регистра сахарного диабета», на 1 января 2024 года численность пациентов с сахарным диабетом 2-го типа (СД2) в РФ достигла 4 805 659 человек, что соответствует

показателю 3211,2 на 100 тыс. населения, и число зарегистрированных случаев заболеваемости СД2 неуклонно растет, несмотря на прогресс в области его лечения и диагностики [2]. Наблюдаемая тенденция дает основание полагать, что существуют патогенетические механизмы, имеющие существенное значение в развитии СД2, которым до сих пор уделяется недостаточное внимание. Анализ литературы показал, что важную роль

в патогенезе СД2 и метаболического синдрома (преддиабета) могут играть механизмы развития системного воспаления, в частности приводящие к увеличению в крови уровня С-реактивного белка (CRP) и провоспалительных цитокинов [1, 8]. Ожирение и пожилой возраст являются основными факторами риска инсулинорезистентности, а хроническая гипергликемия и гиперлипидемия являются метаболическим пусковым звеном преддиабета и СД2, инициирующим каскад провоспалительных реакций, включая активацию эндотелиоцитов и макрофагов [9, 10], активацию в этих других клетках сигнального пути NF- κ B и усиление продукции провоспалительных цитокинов, в совокупности формирующих порочный патогенетический круг, объединяющий воспаление и инсулинорезистентность [8, 11]. Клинически эти метаболические нарушения и провоспалительные реакции проявляются в повышении риска сердечно-сосудистых заболеваний [5].

Цель работы — проанализировать особенности продукции маркеров хронического системного воспаления у пациентов с различными стадиями инсулинорезистентности: преддиабет, компенсированный СД2 и декомпенсированный СД2.

Материалы и методы

Пациенты

В исследование включены пациенты с гипергликемией, страдающие ишемической болезнью сердца и/или гипертонической болезнью, хронической сердечной недостаточностью (ХСН), направленные на консультацию к врачу эндокринологу ($n = 89$, медиана возраста — 65,5 года). Из исследования исключены пациенты, перенесшие инфаркт миокарда, острое нарушение мозгового кровообращения и/или оперативное вмешательство на сердце или сосудах менее года назад, а также страдающие ХСН IV функционального класса по шкале Нью-Йоркской кардиологической ассоциации (NYHA), имеющие на момент исследования острые или обострение хронических заболеваний, включая кетоацидоз, диабетическую стопу.

Все пациенты были разделены на 3 подгруппы:

1. Группа «преддиабет» — пациенты с гипергликемией (уровень глюкозы натощак выше или равен 6,1, но менее 7 ммоль/л в сыворотке и/или уровень постпрандиальной гликемии сыворотки выше или равен 7,8, но ниже 11,1 ммоль/л и уровень гликированного гемоглобина (HbA1c) ниже 6,5 %), что соответствовало диагнозу «гипергликемии натощак» или «нарушения толерантности к глюкозе» (согласно критериям ВОЗ), но без установленного диагноза «СД2» ($n = 26$, медиана возраста — 66 лет, соотношение мужчин/женщин — 46%/54%).

2. Группа «компенсированный СД2» — пациенты с установленным диагнозом «СД2» и находящиеся на терапии пероральными сахароснижающими препаратами. Критерий включения в данную группу — уровень гликированного гемоглобина ниже или равен 7% ($n = 34$, медиана возраста — 68 лет, соотношение мужчин/женщин — 65%/35%).

3. Группа «декомпенсированный СД2» — пациенты с установленным диагнозом «СД2» и находящиеся на терапии пероральными сахароснижающими препаратами. Критерий включения в данную группу — уровень гликированного гемоглобина (HbA1c) $> 7\%$ ($n = 29$, медиана возраста — 64 года, соотношение мужчин/женщин — 47%/53%).

Контрольную группу составили доноры крови ($n = 89$, медиана возраста — 32 года, соотношение мужчин/женщин — 55%/45%).

Исследуемые показатели

У пациентов определяли уровни глюкозы, гликированного гемоглобина (HbA1c) и С-пептида натощак и постпрандиально (через 2 часа после еды) по общепринятым методикам. У всех пациентов и лиц контрольной группы в цитратной плазме крови методом иммуноферментного анализа (Lazurite, Dynex Technologies, Inc., США) с использованием реактивов АО «Вектор-Бест» (г. Новосибирск, Россия) измеряли уровни ключевых параметров СВ: С-реактивного белка (CRP), интерлейкинов IL-6, IL-8, IL-10, фактора некроза опухоли альфа (TNF α), D-димера, кортизола, тропонина I, миоглобина, прокальцитонина (PCT). Исследование проводилось на базе клинико-диагностической лаборатории ООО «Клиника «Уральская».

Статистические методы

Статистический анализ проводили с использованием программного пакета Statistica 12.0 (StatSoft, Inc., США). Распределение данных в группах, оцененное по критерию Шапиро–Уилка, не было нормальным, поэтому в работе использовались непараметрические методы анализа. Данные в таблицах представлены в виде медианы (Me) и нижнего и верхнего квартилей ($Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$). Сравнение абсолютных значений независимых выборок производилось с помощью критерия U Манна–Уитни. Результаты считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Большинство исследованных маркеров системного воспаления у пациентов с инсулинорезистентностью превышали таковые в контрольной группе (табл. 1). При этом наиболее выраженные отклонения наблюдались в отношении CRP, провоспалительных цитоки-

ТАБЛИЦА 1. ЛАБОРАТОРНЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ В ГРУППАХ, Ме (Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 1. LABORATORY VALUES IN THE GROUPS, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

Показатель Parameter	Группа 1 (преддиабет) Group 1 (prediabetes)	Группа 2 (компенсиро- ванный СД2) Group 2 (compensated diabetes)	Группа 3 (декомпенси- рованный СД2) Group 3 (decompensated diabetes)	Контроль Control
Глюкоза, ммоль/л Glucose, mmol/L	7,57 ³ (7,02-10,20)	7,08 ³ (6,54-7,40)	10,09 ^{1, 2} (8,54-11,90)	4,1-6,1*
НbA1c, %	6,6 ^{2, 3} (6,1-7,7)	6,2 ^{1, 3} (5,9-6,5)	8,3 ^{1, 2} (7,6-9,2)	4-6*
С-пептид натощак, нг/мл Fasting C-peptide, ng/mL	1,02 (0,72-1,56)	0,96 (0,70-1,51)	1,10 (0,85-1,60)	0,23-0,81*
С-пептид постприанально, нг/мл Postprandial C-peptide, ng/mL	2,47 (1,66-3,29)	2,68 (2,01-4,29)	2,37 (1,60-2,77)	0,9-1,9*
CRP, мг/л CRP, mg/L	3,08 ³ (1,34-8,11)	3,68 ^{3, К} (2,08-7,18)	8,51 ^{1, 2, К} (3,67-10,71)	2,55 ^{2, 3} (0,94-4,51)
IL-6, пг/мл IL-6, pg/mL	0,56 ³ (0,00-1,98)	1,76 ^К (0,65-3,28)	2,63 ^{1, К} (1,15-6,01)	0,8 ^{2, 3} (0,4-1,4)
IL-8, пг/мл IL-8, pg/mL	10,34 ^К (5,48-32,32)	10,62 ^К (6,32-32,53)	13,47 ^К (6,78-49,0)	1,7 ^{1, 2, 3} (1,3-2,5)
IL-10, пг/мл IL-10, pg/mL	0,22 ³ (0,00-1,15)	1,01 (0,08-2,15)	1,37 ¹ (0,09-3,45)	0,6 (0,0-1,9)
TNFα, пг/мл TNFα, pg/mL	0,0 ^К (0,0-51,5)	10,48 ^К (0,00-28,67)	12,81 ^К (0,00-80,62)	0 ^{1, 2, 3} (0,0-0,4)
D-димер, пг/мл D-dimer, ng/mL	66,6 ^{2, 3, К} (45,1-126,8)	117,9 ^{1, К} (70,0-288,7)	134,9 ^{1, К} (101,7-219,5)	11,5 ^{1, 2, 3} (4,9-30,3)
Кортизол, нмоль/л Cortisol, nmol/L	326,9 ² (266,4-453,9)	432,0 ^{1, К} (348,2-568,4)	414,4 (305,5-572,3)	358,3 ² (278,2-450,1)
Тропонин I, нг/мл Troponin I, ng/mL	0,0 (0,00-0,02)	0,0 ³ (0,0-0,0)	0,0 ^{2, К} (0,00-0,03)	0,0 ³ (0,0-0,0)
Миоглобин, нг/мл Myoglobin, ng/mL	10,41 ² (6,92-13,88)	14,0 ^{1, К} (9,24-20,88)	10,60 ^К (7,35-18,02)	7,73 ^{2, 3} (5,61-13,32)
Прокальцитонин, нг/мл PCT, ng/mL	0,04 ^{3, К} (0,02-0,05)	0,04 ^{3, К} (0,03-0,05)	0,06 ^{1, 2, К} (0,04-0,09)	0,03 ^{1, 2, 3} (0,02-0,03)

Примечание. * – указаны референсные значения показателей; ¹ – статистически значимые отличия от группы 1; ² – статистически значимые отличия от группы 2; ³ – статистически значимые отличия от группы 3; ^К – статистически значимые отличия от контроля.

Note. *, reference values; ¹, significant differences from group 1; ², significant differences from group 2; ³, significant differences from group 3; ^К, significant differences from control group.

нов IL-6, IL-8 и TNFα, свидетельствующие о развитии системной воспалительной реакции, а также маркера микротромбообразования – D-димера. Повышение продукции всех этих цитокинов наблюдалось уже на стадии преддиабета (p < 0,05) по сравнению с контролем и далее достоверно (p < 0,05) нарастало по мере прогрессирования нарушений углеводного обмена (контроль < преддиабет < компенсированный СД2 < декомпенсированный СД2). Несмотря на то, что медианные значения уровня D-димера

находились в пределах референсных значений (до 250 нг/мл), его уровень и частота превышения нормы (250 нг/мл) у пациентов с установленным диагнозом «СД2» значительно превышали таковые у лиц контрольной группы и пациентов с преддиабетом (0% – в контроле, 3,8% – при преддиабете, 29,4% и 24,1% – при компенсированном и декомпенсированном, соответственно. При этом различия между контролем и преддиабетом (с одной стороны) и компенсированным и декомпенсированным СД2 (с другой) были

статистически значимы, а между подгруппами СД2 (компенсированный и декомпенсированный диабет) — недостоверны, что обуславливает повышение риска тромботических осложнений у пациентов с СД2. Также наблюдалось прогрессирующее нарастание сывороточной концентрации РСТ (контроль < преддиабет < компенсированный СД2 < декомпенсированный СД2). Известно, что продукция РСТ повышается в ответ на инфекцию, преимущественно бактериальной этиологии [12]. Поскольку из исследования исключались пациенты с острыми инфекционными процессами, можно предположить, что наблюдаемое повышение уровня РСТ связано с нарушением барьерной функции энтероцитов и транслокацией бактериальных антигенов из кишечника, которые наблюдаются уже на ранних стадиях СД2 [3].

Сопоставимость контрольной и исследуемых групп по IL-10 объясняется с точки зрения его функционального значения: повышение содержания IL-10 в сыворотке крови наблюдается при значительной активации провоспалительных механизмов, связанной с гиперпродукцией провоспалительных цитокинов и острофазных белков в десятки и сотни раз, и может расцениваться как неблагоприятный прогностический признак [6, 14]. Поскольку провоспалительные изменения при СД2 менее выражены, значительного повышения продукции противовоспалительного фактора IL-10 не происходит.

Прогрессирование метаболических нарушений характеризовалось статистически значимым повышением уровней тропонина I и миоглобина,

которые, однако, в большинстве случаев не превышали референсные значения, что свидетельствует о компенсации системного воспалительного процесса, не сопровождающегося системной альтерацией тканей, у данных пациентов.

Со стороны кортизола не наблюдалось достоверного повышения при прогрессировании СД2, что свидетельствует об отсутствии выраженной активации нейроэндокринной системы. Известно, что кортизол, являясь одним из контринсулярных гормонов, усиливает глюконеогенез, подавляет поглощение глюкозы клетками (снижает сродство и количество мембранных рецепторов к инсулину, подавляет транслокацию транспортеров глюкозы) [7]. Известно, что гиперпродукция кортизола при СД2 связана с развитием осложнений в виде нефропатии, ретинопатии, нейропатии [4, 13], поэтому уровень кортизола в пределах нормальных значений у обследованных пациентов можно рассматривать как благоприятный прогностический признак.

Выводы

1. В ответ на метаболические изменения уже на ранних стадиях гипергликемии наблюдается системная активация провоспалительных механизмов, которая прогрессирует по мере нарастания уровня глюкозы и выраженности метаболических нарушений.

2. Наиболее значимые отклонения выявлены со стороны показателей системной воспалительной реакции (CRP, IL-6, IL-8 и TNF α) и микротромбообразования (D-димера).

Список литературы / References

1. Гусев Е.Ю. С-реактивный белок: патогенетическое и диагностическое значение // Уральский медицинский журнал, 2014. Т. 1, № 115. С. 113-121. [Gusev E.Yu. C-reactive protein: pathogenetic and diagnostic value. *Uralskiy meditsinskiy zhurnal* = *Ural Medical Journal*, 2014, Vol. 1, no. 115, pp. 113-121. (In Russ.)]
2. Дедов И.И., Шестакова М.В., Викулова О.К., Железнякова А.В., Исаков М.А., Сазонова Д.В., Мокрышева Н.Г. Сахарный диабет в Российской Федерации: динамика эпидемиологических показателей по данным Федерального регистра сахарного диабета за период 2010–2022 гг. // Сахарный диабет, 2023. Т. 26, № 2. С. 104-123. [Dedov I.I., Shestakova M.V., Vikulova O.K., Zheleznyakova A.V., Isakov M.A., Sazonova D.V., Mokrysheva N.G. Diabetes mellitus in the Russian Federation: dynamics of epidemiological indicators according to the Federal Register of Diabetes Mellitus for the period 2010–2022. *Sakharnyy diabet* = *Diabetes Mellitus*, 2023, Vol. 26, no. 2, pp. 104-123. (In Russ.)]
3. Amar J., Chabo C., Waget A., Klopp P., Vachoux C., Bermúdez-Humarán L.G., Smirnova N., Bergé M., Sulpice T., Lahtinen S., Ouwehand A., Langella P., Rautonen N., Sansonetti P.J., Burcelin R. Intestinal mucosal adherence and translocation of commensal bacteria at the early onset of type 2 diabetes: molecular mechanisms and probiotic treatment. *EMBO Mol. Med.*, 2011, Vol. 3, no. 9, pp 559-572.
4. Chiodini I., Adda G., Scillitani A., Coletti F., Morelli V., Di Lembo S., Epaminonda P., Masserini B., Beck-Peccoz P., Orsi E., Ambrosi B., Arosio M. Cortisol secretion in patients with type 2 diabetes: relationship with chronic complications. *Diabetes Care*, 2007, Vol. 30, no. 1, pp. 83-88.
5. Gusev E., Sarapultsev A. Atherosclerosis and inflammation: insights from the theory of general pathological processes. *Int. J. Mol. Sci.*, 2023, Vol. 24, no. 9, 7910. doi: 10.3390/ijms24097910.
6. Hamers L., Kox M., Pickkers P. Sepsis-induced immunoparalysis: mechanisms, markers, and treatment options. *Minerva Anesthesiol.*, 2015, Vol. 81, pp. 426-439.

7. Janssen J.A.M.J.L. New insights into the role of insulin and Hypothalamic-Pituitary-Adrenal (HPA) axis in the metabolic syndrome. *Int. J. Mol. Sci.*, 2022, Vol. 2, no. 15, 8178. doi: 10.3390/ijms23158178.
8. Lucas R., Parikh S.J., Sridhar S., Guo D.H., Bhagatwala J., Dong Y., Caldwell R., Mellor A., Caldwell W., Zhu H., Dong Y. Cytokine profiling of young overweight and obese female African American adults with prediabetes. *Cytokine*, 2013, Vol. 64, no. 1, pp. 310-315.
9. Mastrogiamaco L., Ballagh R., Venegas-Pino D.E., Kaur H., Shi P., Werstuck G.H. The effects of hyperglycemia on early endothelial activation and the initiation of atherosclerosis. *Am. J. Pathol.*, 2023, Vol. 193, no. 1, pp. 121-133.
10. Megawati E.R., Meutia N., Lubis L.D. The effect of hyperglycaemia on the macrophages in the cell culture. *Folia Morphol. (Warsz.)*, 2022, Vol. 81, no. 2, pp. 387-393.
11. Suryavanshi S.V., Kulkarni Y.A. NF- κ B: A potential target in the management of vascular complications of diabetes. *Front. Pharmacol.*, 2017, Vol. 7, 798. doi: 10.3389/fphar.2017.00798.
12. Taylor R., Jones A., Kelly S., Simpson M., Mabey J. A review of the value of procalcitonin as a marker of infection. *Cureus*, 2017, Vol. 9, no. 4, e1148. doi: 10.7759/cureus.1148.
13. Zhang X., Deng X., Zhou J., Qiu K., Deng M., Lin Z., Mosha S.S., Li W. The association of serum cortisol level with microalbuminuria in patients with type 2 diabetes and prediabetes. *Int. J. Med. Sci.*, 2020, Vol. 17, no. 18, pp. 2998-3004.
14. 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:

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

Турынская Ю.В. — к.м.н., ассистент кафедры госпитальной терапии ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Екатеринбург, Россия

Соколова Л.А. — д.м.н., профессор, профессор кафедры госпитальной терапии ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Екатеринбург, Россия

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

Authors:

Zhuravleva Yu.A., PhD (Biology), senior research associate, Laboratory of Inflammation Immunology, Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, Russian Federation

Turyanskaya Yu.V., PhD (Medicine), Assistant Professor, Department of Hospital Therapy, Ural State Medical University, Ekaterinburg, Russian Federation

Sokolova L.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Hospital Therapy, Ural State Medical University, Ekaterinburg, Russian Federation

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

Поступила 05.03.2025
Отправлена на доработку 09.05.2025
Принята к печати 31.05.2025

Received 05.03.2025
Revision received 09.05.2025
Accepted 31.05.2025

ФЕНОТИПИЧЕСКАЯ И ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАННИХ ТИМИЧЕСКИХ МИГРАНТОВ В ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ В НОРМЕ И ПРИ АУТОИММУННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ

Абрамова Т.Я.¹, Боева О.С.¹, Ангельская О.А.², Борисевич В.И.³,
Аббасова В.С.³, Королев М.А.⁴, Омельченко В.О.⁴, Курочкина Ю.Д.⁴,
Рыбакова А.Д.⁴, Блинова Е.А.¹

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

² ГБУЗ НО «Городская больница № 3», г. Новосибирск, Россия

³ ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения
РФ, г. Новосибирск, Россия

⁴ Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии — филиал ФГБНУ
«Федеральный исследовательский центр “Институт цитологии и генетики” Сибирского отделения
Российской академии наук», г. Новосибирск, Россия

Резюме. Сложные механизмы функционирования тимуса воздействуют на структурный матрикс, способствуя постепенному накоплению генетических мутаций, изменению экспрессии генов и преждевременному иммуностарению. Исследование ранних тимических мигрантов (RTE) необходимо для выявления возможных диагностических биомаркеров и потенциальных контрольных точек аутоиммунных заболеваний. Объектом исследования являлись образцы периферической крови пациентов с ревматоидным артритом (РА), псориатическим артритом (ПсА), псориазом (ПС) и сопоставимых по возрасту условно здоровых доноров. Цель исследования — оценить соотношение недавно мигрировавших из тимуса клеток и наивных Т-регуляторных клеток на периферии в норме и при аутоиммунной патологии. Методом проточной цитофлуориметрии в периферической крови определяли относительное количество недавних тимических мигрантов CD4⁺CD45RA⁺CD31⁺ (RTE) и среди них — число FoxP3⁺ Т-регуляторных клеток (Treg). Кроме того, по внутриклеточному содержанию Ki-67 выявляли число пролиферирующих клеток в исследуемых субпопуляциях. Анализ показал, что число RTE снижено в группе пациентов с РА и пациентов с ПсА относительно группы

Адрес для переписки:

Абрамова Татьяна Яковлевна
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
клинической и фундаментальной иммунологии»
630099, Россия, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14.
Тел.: 8 (383) 227-01-35.
Факс: 8 (383) 222-70-28.
E-mail: tatjana-abramova@mail.ru

Address for correspondence:

Tatiana Ya. Abramova
Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology
14 Yadrintsevskaia St
Novosibirsk
630099 Russian Federation
Phone: +7 (383) 227-01-35.
Fax: +7 (383) 222-70-28.
E-mail: tatjana-abramova@mail.ru

Образец цитирования:

Т.Я. Абрамова, О.С. Боева, О.А. Ангельская,
В.И. Борисевич, В.С. Аббасова, М.А. Королев,
В.О. Омельченко, Ю.Д. Курочкина, А.Д. Рыбакова,
Е.А. Блинова «Фенотипическая и функциональная
характеристика ранних тимических мигрантов
в периферической крови в норме и при аутоиммунных
заболеваниях» // Российский иммунологический
журнал, 2025. Т. 28, № 3. С. 757–764.
doi: 10.46235/1028-7221-17101-PAF

© Абрамова Т.Я. и соавт., 2025

Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

T. Ya. Abramova, O. S. Boeva, O. A. Angelskaya,
V. I. Borisevich, V. S. Abbasova, M. A. Korolev,
V. O. Omelchenko, Yu. D. Kurochkina, A. D. Rybakova,
E. A. Blinova “Phenotypic and functional characteristics
of early thymic cells migrating to peripheral blood under normal
conditions and in autoimmune disorders”, Russian Journal
of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2025,
Vol. 28, no. 3, pp. 757–764.
doi: 10.46235/1028-7221-17101-PAF

© Abramova T. Ya. et al., 2025

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

DOI: 10.46235/1028-7221-17101-PAF

доноров (17,3%, 18,6% vs 23,6%) и достоверно не изменяется у пациентов с псориазом. При этом по числу пролиферирующих клеток достоверных отличий между группами не было зафиксировано. Также не было выявлено отличий при анализе числа Treg среди CD4⁺CD45RA⁺CD31⁺ лимфоцитов между донорами и пациентами с аутоиммунными заболеваниями. Уровень пролиферации Т-регуляторных клеток у пациентов с псориатической патологией был сопоставим с донорскими значениями, а при РА наблюдалась тенденция к увеличению числа пролиферирующих FoxP3⁺ клеток относительно доноров. Также у пациентов с РА число пролиферирующих наивных FoxP3⁺Treg было достоверно выше числа пролиферирующих RTE (15,8% vs 3,1%, $p < 0,05$ соответственно). Снижение относительного количества недавних мигрантов из тимуса при аутоиммунных заболеваниях может быть связано с активацией Т-лимфоцитов и увеличением доли центральных Т-клеток памяти, что было подтверждено ранее. Число Treg среди RTE и уровень их пролиферации у пациентов с псориатической патологией, сопоставимых с донорскими значениями, свидетельствует об отсутствии нарушений в генерации Т-регуляторных клеток в тимусе. Неоднозначные результаты, полученные у пациентов с РА, имеющие возможные перспективы в диагностике и терапии, нуждаются в дополнительном подтверждении на большей выборке пациентов.

Ключевые слова: ранние тимические мигранты, Т-регуляторные клетки, аутоиммунные заболевания, ревматоидный артрит, псориатический артрит, псориаз

PHENOTYPIC AND FUNCTIONAL CHARACTERISTICS OF EARLY THYMIC CELLS MIGRATING TO PERIPHERAL BLOOD UNDER NORMAL CONDITIONS AND IN AUTOIMMUNE DISORDERS

Abramova T.Ya.^a, Boeva O.S.^a, Angelskaya O.A.^b, Borisevich V.I.^c,
Abbasova V.S.^c, Korolev M.A.^d, Omelchenko V.O.^d, Kurochkina Yu.D.^d,
Rybakova A.D.^d, Blinova E.A.^a

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

^b City Hospital No. 3, Novosibirsk, Russian Federation

^c Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russian Federation

^d Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology – Branch of the Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation

Abstract. Complex mechanisms of thymus functioning affect its structural matrix thus promoting gradual accumulation of genetic mutations, changes in gene expression and premature immunosenescence. The study of early thymic cell migrants (ETM) is necessary to identify possible diagnostic biomarkers and potential checkpoints of autoimmune diseases (AID). We have studied peripheral blood samples of patients with rheumatoid arthritis (RA), psoriatic arthritis (PsA), psoriasis (PS) and healthy donors. The aim of the study was to assess the ratio of recent cell migrants from the thymus and circulating naive T regulatory cells in healthy persons and autoimmune disorders. The relative numbers of recent thymic migrants CD4⁺CD45RA⁺CD31⁺ (ETM), and the contents of FoxP3⁺T regulatory cells (Treg) in this population were determined by flow cytometry. The number of proliferating cells was determined by intracellular Ki-67 marker. The results show that the number of ETM was reduced in the group of patients with RA and patients with PsA compared with the healthy donor group (17.3%, 18.6% vs. 23.6%), and did not change significantly in patients with psoriasis. There were no significant differences between donors and patients with AIDs on the contents of proliferating ETM and Tregs. The proliferation rates of T regulatory cells in patients with psoriatic pathology were comparable to donor values, with a trend for its increase in RA patients. The numbers of proliferating naive FoxP3⁺Tregs in RA patients was significantly higher than the numbers of proliferating ETM (15.8% vs 3.1%, $p < 0.05$, respectively). A decrease in relative number of ETM in AID may be associated with activation of T lymphocytes and higher proportion of central memory T cells. The number of Tregs among ETM, and

their proliferation rates in patients with psoriatic disorder suggest the absence of disturbed Treg generation in thymus. The ambiguous results obtained in patients with RA are of potential significance for diagnostics and therapy. However, they require additional confirmation in a larger sample of patients.

Keywords: early thymic cell migrants, T regulatory cells, autoimmune diseases, rheumatoid arthritis, psoriatic arthritis, psoriasis

Введение

Развитие Т-лимфоцитов осуществляется в несколько этапов, важнейшим из которых является формирование аутоотолерантности Т-клеток в тимусе. Наиболее ранними и антигенно наивными Т-клетками, выходящими из тимуса и фенотипически определяемыми в периферической крови у человека, являются «ранние тимические мигранты» (Recent Thymus Emigrant, RTE). Являясь источником RTE, тимус обеспечивает питательную среду для дифференцировки и селекции Т-клеток [5]. Взаимодействуя с клетками тимуса в процессе положительного и отрицательного отбора развивающийся репертуар Т-клеток ($\alpha\beta$ TCR) должен гарантировать функциональность и аутоотолерантность Т-клеток, экспортируемых на периферию [5]. Большая часть выживших одиночных позитивных (SP single positive) тимоцитов ($CD4^+$ или $CD8^+$), прошедших контрольную точку отрицательного отбора, завершают свое интратимическое развитие и эмигрируют из тимуса в виде наивных $CD4^+$ или $CD8^+$ $\alpha\beta$ Т-клеток (RTE) [3, 8]. Основные субпопуляции Т-клеток, которые генерируются в тимусе, представляют собой обычные (Tconv) $\alpha\beta$ Т-клетки, каждая из которых наделена потенциалом экспрессировать Т-клеточный рецептор (TCR) определенной специфичности. Помимо генерации наивных $\alpha\beta$ Т-клеток мозговое вещество тимуса способствует образованию натуральных $CD4^+$ FoxP3⁺ наивных Т-регуляторных клеток (Treg). Развитие тимических Treg обусловлено взаимодействием $\alpha\beta$ TCR с собственным пептидом/МНС с аффинностью выше, чем у положительно отобранных обычных наивных SP-timoцитов, но ниже порога отрицательного отбора. Treg-клетки опосредуют установление и поддержание иммунологической аутоотолерантности и Т-клеточного гомеостаза у людей [7]. Предполагается, что усиление толерантности Т-клеток посредством негативного отбора скорее всего не является абсолютным, поскольку аутореактивные клоны Т-клеток способны уклоняться от интратимической делеции и проникать в периферический репертуар [7, 8]. В предотвращении аутореактивных процессов, являющихся результатом функционирования аутореактивных Т-эффекторных клеток на периферии, роль Treg доминантна, о чем свидетельствуют аутоиммунные дефекты, возникающие при отсутствии Treg

как у людей, так и у мышей [13, 14]. RTE связывают продукцию тимуса и пул рециркулирующих Т-клеток, поддерживая в достаточном количестве периферические Т-клетки, обеспечивает разнообразие их $\alpha\beta$ Т-клеточных рецепторов, а также необходимое количество Treg, [2, 9, 10]. Нарушения функции тимуса, дисбаланс RTE и Treg были обнаружены как критические факторы патогенеза таких заболеваний, как диабет 1-го типа, рассеянный склероз, ювенильный идиопатический артрит, хроническая сердечная недостаточность, ВИЧ [15].

Таким образом, в тимусе формируется микроокружение, обеспечивающее образование и развитие наивных Т-лимфоцитов, а также этапы позитивной и негативной селекции. Правильное функционирование тимуса является важным фактором для снижения заболеваемости и смертности. Нарушение архитектуры тимуса, его клеточности, функциональной активности клеток, вызванное атрофией, дегенерацией, инволюцией, может приводить к снижению выхода наивных Т-клеток и ограниченному разнообразию TCR, нарушению образования Treg, а также к увеличению выхода аутореактивных Т-клеток, которое имеет большое значение для развития аутоиммунных заболеваний (АИЗ) [15]. Известно, что количественные и качественные изменения RTE наблюдаются при многих заболеваниях человека. Несмотря на потенциальное клиническое значение изменений RTE, точные связи между RTE и развитием АИЗ остаются плохо изученными и существует необходимость в таких исследованиях.

Целью настоящей работы являлась оценка соотношения недавно мигрировавших из тимуса клеток (RTE) и наивных Т-регуляторных клеток на периферии в норме и при аутоиммунной патологии.

Материалы и методы

Выделение мононуклеарных клеток (МНК) из гепаринизированной периферической крови доноров и пациентов с ревматоидным артритом, псориазом и псориатическим артритом осуществляли методом центрифугирования в градиенте плотности фиколл-урографина ($\rho = 1,077$; ООО «ПанЭко», Москва). Выделенные МНК в количестве 1,5–2 млн фенотипировали методом многоцветной проточной цитометрии. Клетки

периферической крови окрашивали конъюгированными с флуорохромами моноклональными антителами к поверхностным маркерам недавних тимических мигрантов (CD3, CD4, CD31 и CD45RA), Т-регуляторных клеток (CD4, CD25) в количестве рекомендуемом производителем в течение 15 минут при комнатной температуре в темноте. После чего клетки отмывали 1 мл раствора PBS с 0,02% EDTA и 0,5% FCS (Staining Buffer) при 1100 об/мин в течение 5 минут. Затем клетки фиксировали и пермеабilizировали набором буферов CytoFix/CytoPerm (BD, США) согласно инструкции производителя. Далее клетки окрашивали антителами к внутриклеточным маркерам Ki-67 и FoxP3 в течении 30 минут при комнатной температуре в темноте. После окрашивания клетки отмывали 1 mL 1xPerm/Wash при 300 g 5 минут. Анализ проб проводили в 210 мкл Staining Buffer. Использовались следующие панели: 1. CD31-PE/Cy7 (Elabscience, США) и CD3-FITC, CD4-PE, CD45RA-APC/Cy7, CD25-PE/Cy5, Ki-67-APC (BioLegend, США); 2. CD31-PE/Cy7 (Elabscience, США) и CD4-FITC, CD25-PE/Cy5, CD45RA-APC/Cy7, FoxP3-PE, Ki-67-APC (BioLegend, США). Анализ проводили на проточном цитофлуориметре FACS Canto II (BD, США) с использованием программного обеспечения FACS Diva 6.0 (BD, США) и на проточном цитофлуориметре LongCyte (Challenbio, Китай) в программном обеспечении ModelFlower (Challenbio, Китай). Число пролиферирующих клеток в субпопуляциях определяли как процент позитивных по маркеру Ki-67 клеток. Статистический анализ полученных данных проводили с использованием пакета GraphPadPrism 9 (GraphPad, США). Согласно критерию Шапиро–Уилка распределение не соответствовало нормальному, поэтому применялись методы непараметрической статистики. Для сравнения несвязанных переменных использовали U-критерий Манна–Уитни. Для множественного сравнения групп применялся дисперсионный анализ с постериорным попарным сравнением для выявления отличающихся групп. Выявленные отличия считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$. Результаты представлены в виде медианы и интерквартильного размаха, возраст и данные опросников представлен в виде среднего и ошибки среднего.

Результаты и обсуждение

В исследование было включено 6 пациентов с ревматоидным артритом (РА), 8 пациентов с вульгарным псориазом (ПС), 6 пациентов с псориатическим артритом (ПсА) и 8 условно здоровых доноров. Характеристика лиц, включенных в исследование, представлена в таблице 1.

Пациенты с РА были с низкой, умеренной и высокой активностью заболевания согласно индексам DAS28 и CDAI. Пациенты с ПС имели преимущественно легкое течение псориаза в соответствии с индексом PASI, а пациенты с ПсА имели легкое течение псориаза и низкую, умеренную и высокую активность артрита в соответствии с индексами PASI и DAPSA. Сложности в исследовании ранних тимических мигрантов связаны с отсутствием специфичных исключительно для RTE биомаркеров, тем не менее на сегодняшний день выделены молекулы, позволяющие обнаружить эти клетки на периферии. После выхода из тимуса $CD4^+$ RTE экспрессируют высокие уровни мембранного гликопротеина CD31 (PECAM-1) [12]. Истинно наивные $CD4^+CD31^+$ клетки имеют высокое содержание TRECs относительно центральных наивных Т-клеток ($CD4^+CD45RA^+CD31^-$), кроме того, частота данной популяции снижается с возрастом [4, 12]. Прямая зависимость между экспрессией CD31 и наличием эксцизионных колец Т-клеточного рецептора в клетке, делает эту молекулу наиболее привлекательным в использовании маркером RTE, поскольку ПЦР, применяемая при определении непосредственно TRECs, сопровождается разрушением клеток, что ограничивает параллельное окрашивание [4, 12]. Методом проточной цитофлуориметрии в периферической крови пациентов с аутоиммунными заболеваниями и доноров без выявленной аутоиммунной патологии определяли относительное количество недавних тимических мигрантов $CD4^+CD45RA^+CD31^+$. Анализ показал, что число недавних тимических мигрантов снижено в группе пациентов с РА и пациентов с ПсА относительно группы доноров. Число RTE в данных группах составило 17,3 (11,2–20,6) %, 18,6 (14,2–21,6) % против 23,6 (22,1–26,9) % $p < 0,05$ соответственно. За 100% было принято число клеток в гейте $CD4^+$ лимфоцитов. Данные представлены в виде медианы и интерквартильного размаха. По числу ранних мигрантов группа пациентов с ПС статистически достоверно не отличалась от группы доноров и составила 14,7 (7,6–32,5) %. Далее мы выявляли долю $FoxP3^+Treg$ среди недавних тимических мигрантов ($CD4^+CD45RA^+CD31^+$) для оценки соотношения RTE и наивных Treg. Достоверных отличий по содержанию $FoxP3^+Treg$ среди ранних тимических мигрантов $CD4^+CD45RA^+CD31^+$ в периферической крови доноров (D) и пациентов с псориазом (Ps), псориатическим артритом (PSA), ревматоидным артритом (RA) между исследуемыми группами не было зафиксировано. При анализе за 100% было принято число клеток в гейте $CD4^+CD45RA^+CD31^+$ лимфоцитов. Как известно, периферический пул Т-лимфоцитов в

ТАБЛИЦА 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЛИЦ, ВКЛЮЧЕННЫХ В ИССЛЕДОВАНИЕ

TABLE 1. CHARACTERISTICS OF INDIVIDUALS INCLUDED IN THE STUDY

	Доноры Donors (n = 8)	Псориаз Psoriasis (n = 8)	Псориатический артрит Psoriatic arthritis (n = 6)	Ревматоидный артрит Rheumatoid arthritis (n = 6)
Возраст, годы Age, years	41,4±3,1	44,4±5,4	55,3±5,1	40,3±1,9
Пол: м/ж (%) Gender: m/f	1/7 (12,5/87,5)	5/3 (62,5/37,5)	1/5 (16,7/83,3)	0/6 (0/100)
PASI	–	10,3±2,3	4,9±1,8	–
DAPSA	–	–	21,4±5,9	–
DAS28	–	–	–	3,47±0,63
CDAI	–	–	–	12,3±4,5

Примечание. Данные представлены: среднее ± ошибка среднего (M±m). CDAI – клинический индекс активности болезни; DAPSA – индекс активности псориатического артрита; DAS28 – индекс активности ревматоидного артрита по 28 суставам; PASI – индекс площади и тяжести псориаза.

Note. Data are presented as mean ± error of the mean (M±m). CDAI, Clinical Disease Activity Index; DAPSA, Disease Activity index for Psoriatic Arthritis; DAS28, Disease Activity Score 28; PASI, Psoriasis Area and Severity Index.

организме поддерживается 2 механизмами: образованием и выходом новых наивных Т-клеток из тимуса, а также гомеостатической пролиферацией наивных Т-клеток на периферии. Показано, что под действием IL-7 наивные Т-клетки способны пролиферировать с сохранением экспрессии CD31 и статуса наивных Т-лимфоцитов (1, 11). Кроме того, для РА описано, что гомеостатическая пролиферация вносит вклад в па-

тогенез данного АИЗ. Поэтому мы оценили по экспрессии внутриклеточного белка Ki-67 число пролиферирующих клеток среди RTE и наивных FoxP3⁺Treg. Оказалось, что по уровню пролиферирующих клеток RTE-доноров и пациентов с ПС, ПсА РА достоверно не отличались друг от друга (табл. 2).

Число пролиферирующих наивных FoxP3⁺Treg у пациентов с псориатическими заболеваниями-

ТАБЛИЦА 2. ЧИСЛО ПРОЛИФЕРИРУЮЩИХ КЛЕТОК СРЕДИ CD4⁺CD45RA⁺CD31⁺ ЛИМФОЦИТОВ И НАИВНЫХ FoxP3⁺Treg В ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ДОНОРОВ И ПАЦИЕНТОВ С ПСОРИАЗОМ, ПСОРИАТИЧЕСКИМ АРТРИТОМ, РЕВМАТОИДНЫМ АРТРИТОМ.

TABLE 2. THE NUMBER OF PROLIFERATING CELLS AMONG CD4⁺CD45RA⁺CD31⁺ LYMPHOCYTES AND NAIVE FoxP3⁺Tregs IN THE PERIPHERAL BLOOD OF DONORS AND PATIENTS WITH PSORIASIS, PSORIATIC ARTHRITIS, AND RHEUMATOID ARTHRITIS.

Группа Group	Ki-67 ⁺ RTE, %	Ki-67 ⁺ Treg, %
Доноры Donors	2,6 (1,9-3,8)	2,5 (1,6-12,0)
Пациенты с псориазом Patients with psoriasis	2,4 (1,3-2,6)	8,6 (1,6-19,1)
Пациенты с псориатическим артритом Patients with psoriatic arthritis	2,0 (1,6-2,8)	4,5 (1,7-5,6)
Пациенты с ревматоидным артритом Patients with rheumatoid arthritis	3,1 (2,1-5,4)	15,8 (7,4-28,2) [#]

Примечание. [#] – достоверное отличие от числа пролиферирующих клеток среди CD4⁺CD45RA⁺CD31⁺ лимфоцитов пациентов с РА. За 100% принято число клеток в гейте CD4⁺CD45RA⁺CD31⁺ лимфоцитов (RTE) и число клеток в гейте CD4⁺CD45RA⁺CD31⁺FoxP3⁺ лимфоцитов (Treg). Данные представлены в виде медианы и интерквартильного размаха.

Note. [#], reliable difference from the number of proliferating cells among CD4⁺CD45RA⁺CD31⁺ lymphocytes of patients with RA. The number of cells in the gate of CD4⁺CD45RA⁺CD31⁺ lymphocytes (RTE) and the number of cells in the gate of CD4⁺CD45RA⁺CD31⁺FoxP3⁺ lymphocytes (Treg) are taken as 100%. Data are presented as median and interquartile range.

ми (ПС и ПсА) находилось на уровне донорских значений (табл. 2). Однако у пациентов с РА число пролиферирующих наивных FoxP3⁺Treg было достоверно выше числа пролиферирующих RTE (табл. 2), кроме того, оно имело тенденцию к увеличению по сравнению с числом пролиферирующих наивных FoxP3⁺Treg у доноров ($p = 0,082$).

Таким образом, при аутоиммунных заболеваниях, связанных с артропатией, происходит снижение относительного количества недавних мигрантов из тимуса, что может быть связано с уменьшением их относительного количества за счет возрастания активированных Т-лимфоцитов и доли центральных Т-клеток памяти, что было подтверждено нами ранее [6]. Число Treg-клеток среди недавних мигрантов из тимуса и уровень их пролиферации у пациентов с псориатической патологией было сопоставимо с донорскими значениями, что говорит об отсутствии нарушений в генерации Т-регуляторных клеток в тимусе. При РА наблюдается усиление пролиферации наивных FoxP3⁺Treg на периферии, что может отражать нарушения в образовании Т-регуляторных клеток в тимусе и запуск компенсаторных механизмов для пополнения данной популяции. Как известно, в процессе пролиферации, индукции Treg на периферии утрачивается стабильность экспрессии FoxP3 и возрастает пластичность Treg, их способность переходить в патогенные

популяции (exFoxP3), экспрессирующие провоспалительные цитокины. Для того чтобы сделать однозначные выводы при РА и открыть возможные перспективы для диагностических и терапевтических стратегий, необходимо увеличить группу пациентов.

Заключение

В исследовании установлено снижение RTE в группе пациентов с РА и ПсА, тогда как уровень RTE у пациентов с ПС достоверно не отличался от такового у доноров. Учитывая, что в группах пациентов с псориатическими заболеваниями (ПС и ПсА) доля наивных FoxP3⁺Treg среди RTE, а также число пролиферирующих клеток в периферической крови среди RTE и наивных FoxP3⁺Treg были сопоставимы с показателями доноров, можно сказать, что при псориатических заболеваниях отсутствуют изменения в процессе тимопоэза. Снижение RTE в данном случае может быть связано с активацией Т-клеток и увеличением числа центральных Т-клеток памяти в периферической крови. При РА изменения затрагивают не только RTE, но и число пролиферирующих наивных FoxP3⁺Treg, что предполагает нарушения в образовании Т-регуляторных клеток в тимусе и нуждается в дополнительном подтверждении на большей выборке пациентов.

Список литературы / References

1. Ao Y.Q., Jiang J.H., Gao J., Wang H.K., Ding J.Y. Recent thymic emigrants as the bridge between thymoma and autoimmune diseases. *Biochim. Biophys. Acta Rev. Cancer*, 2022, Vol. 1877, no. 3, 188730. doi: 10.1016/j.bbcan.2022.188730.
2. Azevedo R.I., Soares M.V., Barata J.T., Tendeiro R., Serra-Caetano A., Victorino R.M., Sousa A.E. IL-7 sustains CD31 expression in human naive CD4⁺ T cells and preferentially expands the CD31⁺ subset in a PI3K-dependent manner. *Blood*, 2009, Vol. 113, no. 13, pp. 2999-3007.
3. Houston E.G. Jr., Fink P.J. MHC drives TCR repertoire shaping, but not maturation, in recent thymic emigrants. *J. Immunol.*, 2009, Vol. 183, no. 11, pp. 7244-7249.
4. James K.D., Cosway E.J., Lucas B., White A.J., Parnell S.M., Carvalho-Gaspar M., Tumanov A.V., Anderson G., Jenkinson W.E. Endothelial cells act as gatekeepers for LTβR-dependent thymocyte emigration. *J. Exp. Med.*, 2018, Vol. 215, no. 12, pp. 2984-2993.
5. James K.D., Cosway E.J., Parnell S.M., White A.J., Jenkinson W.E., Anderson G. Assembling the thymus medulla: Development and function of epithelial cell heterogeneity. *Bioessays*, 2024, Vol. 46, no. 3, e2300165. doi: 10.1002/bies.202300165.
6. Junge S., Kloeckener-Gruissem B., Zufferey R., Keisker A., Salgo B., Fauchere J.C., Scherer F., Shalaby T., Grotzer M., Siler U., Seger R., Gungör T. Correlation between recent thymic emigrants and CD31⁺ (PECAM-1) CD4⁺ T cells in normal individuals during aging and in lymphopenic children. *Eur. J. Immunol.*, 2007, Vol. 37, no. 11, pp. 3270-3280.
7. Kohler S., Thiel A. Life after the thymus: CD31⁺ and CD31⁻ human naive CD4⁺ T-cell subsets. *Blood*, 2009, Vol. 113, no. 4, pp. 769-774.
8. Kolerova A.V., Mikailova D.A., Beimanova M.A., Blinova E.A. Characterization of central and effector CD4⁺ memory cells in psoriasis. *Medical Immunology (Russia)*, 2021, Vol. 23, no. 4, pp. 969-974. doi: 10.15789/1563-0625-COC-2288.
9. Legoux F.P., Lim J.B., Cauley A.W., Dikiy S., Ertelt J., Mariani T.J., Sparwasser T., Way S.S., Moon J.J. CD4⁺ T cell tolerance to tissue-restricted self antigens is mediated by antigen-specific regulatory T cells rather than deletion. *Immunity*, 2015, Vol. 43, no. 5, pp. 896-908.

10. Paiva R.S., Lino A.C., Bergman M.L., Caramalho I., Sousa A.E., Zelenay S., Demengeot J. Recent thymic emigrants are the preferential precursors of regulatory T cells differentiated in the periphery. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2013, Vol. 110, no. 16, pp. 6494-6499.
11. Silva S.L., Albuquerque A.S., Matoso P., Charmeteau-de-Muylder B., Cheynier R., Ligeiro D., Abecasis M., Anjos R., Barata J.T., Victorino R.M., Sousa A.E. IL-7-Induced Proliferation of Human Naive CD4 T-Cells Relies on Continued Thymic Activity. *Front. Immunol.*, 2017, Vol. 8, 20. doi: 10.3389/fimmu.2017.00020. PMC5243809.
12. Takahashi T., Tagami T., Yamazaki S., Uede T., Shimizu J., Sakaguchi N., Mak T.W., Sakaguchi S. Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *J. Exp. Med.*, 2000, Vol. 192, no. 2, pp. 303-310.
13. Taves M.D., Ashwell J.D. Glucocorticoids in T cell development, differentiation and function. *Nat. Rev. Immunol.*, 2021, Vol. 21, no. 4, pp. 233-243.
14. Thiault N., Darrigues J., Adoue V., Gros M., Binet B., Peralas C., Leobon B., Fazilleau N., Joffre O.P., Robey E.A., van Meerwijk J.P., Romagnoli P. Peripheral regulatory T lymphocytes recirculating to the thymus suppress the development of their precursors. *Nat. Immunol.*, 2015, Vol. 16, no. 6, pp. 628-634.
15. Wildin R.S., Ramsdell F., Peake J., Faravelli F., Casanova J.L., Buist N., Levy-Lahad E., Mazzella M., Goulet O., Perroni L., Bricarelli F.D., Byrne G., McEuen M., Proll S., Appleby M., Brunkow M.E. X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurfy. *Nat. Genet.*, 2001, Vol. 27, no. 1, pp. 18-20.

Авторы:

Абрамова Т.Я. — д.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории клинической иммунопатологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт клинической и фундаментальной иммунологии», г. Новосибирск, Россия

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

Ангельская О.А. — врач-дерматовенеролог ГБУЗ НО «Городская больница № 3», г. Новосибирск, Россия

Борисевич В.И. — студент ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Новосибирск, Россия

Аббасова В.С. — студент ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Новосибирск, Россия

Королев М.А. — д.м.н., врач-ревматолог, заведующий лабораторией патологии соединительной ткани, Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии — филиал ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр «Институт цитологии и генетики» Сибирского отделения Российской академии наук», г. Новосибирск, Россия

Омельченко В.О. — к.м.н., врач-ревматолог отделения ревматологии, научный сотрудник лаборатории патологии соединительной ткани, Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии — филиал ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр «Институт цитологии и генетики» Сибирского отделения Российской академии наук», г. Новосибирск, Россия

Authors:

Abramova T.Ya., PhD, MD (Medicine), Leading Researcher, Laboratory of Clinical Immunopathology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Boeva O.S., Postgraduate Student, Laboratory of Clinical Immunopathology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Angelskaya O.A., Dermatovenerologist, City Hospital No. 3, Novosibirsk, Russian Federation

Borisevich V.I., Student, Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russian Federation

Abbasova V.S., Student, Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russian Federation

Korolev M.A., PhD, MD (Medicine), Rheumatologist, Head, Laboratory of Connective Tissue Pathology, Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology — Branch of the Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation

Omelchenko V.O., PhD (Medicine), Rheumatologist, Department of Rheumatology, Researcher, Laboratory of Connective Tissue Pathology, Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology — Branch of the Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation

Курочкина Ю.Д. — к.м.н., врач-ревматолог отделения ревматологии, научный сотрудник лаборатории патологии соединительной ткани, Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии — филиал ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр «Институт цитологии и генетики» Сибирского отделения Российской академии наук», г. Новосибирск, Россия

Рыбакова А.Д. — младший научный сотрудник лаборатории фармакологического моделирования и скрининга биоактивных молекул, Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии — филиал ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр «Институт цитологии и генетики» Сибирского отделения Российской академии наук», г. Новосибирск, Россия

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

Kurochkina Yu.D., PhD (Medicine), Rheumatologist, Department of Rheumatology, Researcher, Laboratory of Connective Tissue Pathology, Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology — Branch of the Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation

Rybakova A.D., Junior Researcher, Laboratory of Pharmacological Modeling and Screening of Bioactive Molecules, Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology — Branch of the Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation

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

Поступила 27.02.2025
Отправлена на доработку 06.05.2025
Принята к печати 25.05.2025

Received 27.02.2025
Revision received 06.05.2025
Accepted 25.05.2025

НОВЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ ДИНАМИЧЕСКОЙ ОЦЕНКИ СИСТЕМНОЙ ВОСПАЛИТЕЛЬНОЙ РЕАКЦИИ У ПАЦИЕНТОВ С РЕВМАТОИДНЫМ АРТРИТОМ

Александров В.А.^{1,2}, Емельянов Н.И.¹, Александров А.В.^{1,2},
Зборовская И.А.²

¹ ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения
РФ, г. Волгоград, Россия

² ФГБНУ «Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной ревматологии имени
А.Б. Зборовского», г. Волгоград, Россия

Резюме. Системное воспаление при ревматоидном артрите (РА) связано с изменениями как в количестве, так и в составе циркулирующих воспалительных клеток крови, таких как нейтрофилы и лимфоциты. Точный мониторинг интенсивности воспаления и статуса заболевания у пациентов с РА важен в условиях стационарного наблюдения. Цель исследования: определение воспалительных индексов, полученных из общего анализа крови (ОАК), у пациентов с активным РА в процессе стационарного лечения и изучение связи данных индексов с клинико-лабораторными параметрами заболевания. Определение воспалительных индексов (NLR — соотношение нейтрофилов и лимфоцитов, MLR — соотношение моноцитов и лимфоцитов, PLR — соотношение тромбоцитов и лимфоцитов, SII — индекс системного иммунного воспаления, SIRI — индекс системной воспалительной реакции) было проведено по результатам ОАК, выполненных с помощью автоматизированных гематологических анализаторов у 43 пациентов с РА (55,8% мужчин; в возрасте от 22 до 78 лет; 88% с высокой активностью заболевания) дважды (при поступлении на стационарное лечение и при выписке). Средний срок нахождения пациентов в стационаре составил 14 [9;14] дней. Общепринятые маркеры воспаления (СОЭ и СРБ) коррелировали между собой ($r_s = 0,64$); были обнаружены корреляции СРБ с количеством лейкоцитов ($r_s = 0,47$), с PLR ($r_s = 0,43$) и возрастом пациентов ($r_s = 0,34$), а также корреляции СОЭ с PLR ($r_s = 0,37$) и возрастом больных РА ($r_s = 0,33$). Индекс SII сильно коррелировал с NLR ($r_s = 0,85$) и PLR ($r_s = 0,86$), умеренно с MLR ($r_s = 0,49$), но не с SIRI ($p > 0,05$). Индекс SIRI показывал наличие степенной зависимости с DAS-28 ($\beta = -0,072$, $p = 0,008$). Маркеры, полученные из ОАК, не были связаны ни с возрастом, ни с полом обследованных лиц (за исключением SIRI, $p = 0,027$),

Адрес для переписки:

Александров Андрей Вячеславович
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
клинической и экспериментальной ревматологии
имени А.Б. Зборовского»
400138, Россия, г. Волгоград, ул. им. Землячки, 76.
Тел.: 8 (8442) 78-90-98.
E-mail: imlab@mail.ru

Address for correspondence:

Andrey V. Aleksandrov
A. Zborovsky Research Institute of Clinical
and Experimental Rheumatology
76 Zemlyachka St
Volgograd
400138 Russian Federation
Phone: +7 (8442) 78-90-98.
E-mail: imlab@mail.ru

Образец цитирования:

В.А. Александров, Н.И. Емельянов, А.В. Александров,
И.А. Зборовская «Новые возможности динамической
оценки системной воспалительной реакции у
пациентов с ревматоидным артритом» // Российский
иммунологический журнал, 2025. Т. 28, № 3. С. 765-772.
doi: 10.46235/1028-7221-17118-NOF

© Александров В.А. и соавт., 2025

Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

V.A. Aleksandrov, N.I. Emelyanov, A.V. Aleksandrov,
I.A. Zborovskaya "New opportunities for dynamic evaluation
of systemic inflammatory response in patients with rheumatoid
arthritis", Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy
Immunologicheskii Zhurnal, 2025, Vol. 28, no. 3, pp. 765-772.
doi: 10.46235/1028-7221-17118-NOF

© Aleksandrov V.A. et al., 2025

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

DOI: 10.46235/1028-7221-17118-NOF

не было обнаружено межгрупповых различий в исследуемых гематологических маркерах при разделении больных РА по содержанию антител к циклическому цитруллинированному пептиду, наличию эрозий и системных проявлений (за исключением PLR, $p = 0,048$). Только СРБ и индекс системного иммунного воспаления (SII) продемонстрировали достоверное снижение ($p = 0,24$ и $p = 0,43$ соответственно) в процессе стационарного лечения пациентов с РА. Не было обнаружено преимуществ в использовании двухкомпонентных индексов (NLR, MLR, PLR) в качестве полезных инструментов как для оценки воспалительного статуса, так и при ведении пациентов с высокоактивным РА. Индекс SII, объединяя прогностическое значение трех параметров (тромбоциты, нейтрофилы и лимфоциты), может считаться не только более мощным для прогнозирования воспаления, чем однокомпонентные или двухкомпонентные гематологические маркеры, но и быть ценным инструментом для мониторинга воспаления и прогрессирования РА. Таким образом, индекс SII (наряду с СРБ) может быть востребован в качестве потенциального биомаркера для определения результатов стационарного лечения пациентов с высокоактивным РА.

Ключевые слова: ревматоидный артрит, активность, DAS28, системный иммунновоспалительный индекс, С-реактивный белок, СОЭ

NEW OPPORTUNITIES FOR DYNAMIC EVALUATION OF SYSTEMIC INFLAMMATORY RESPONSE IN PATIENTS WITH RHEUMATOID ARTHRITIS

Aleksandrov V.A.^{a, b}, Emelyanov N.I.^a, Aleksandrov A.V.^{a, b},
Zborovskaya I.A.^b

^a Volgograd State Medical University, Volgograd, Russian Federation

^b A. Zborovsky Research Institute of Clinical and Experimental Rheumatology, Volgograd, Russian Federation

Abstract. Systemic inflammation in rheumatoid arthritis (RA) is associated with changes in both counts and composition of circulating inflammatory blood cells such as neutrophils and lymphocytes. Accurate monitoring of inflammation grade and disease status in patients with RA is important in the inpatient setting. Purpose of the study was to determine inflammatory indices derived from the general blood counts (GBC) in patients with active RA during inpatient treatment, and to search for association of these indices with clinical and laboratory parameters of the disease. The inflammatory indices (NLR, neutrophil-to-lymphocyte ratio; MLR, monocyte-to-lymphocyte ratio; PLR, platelet-to-lymphocyte ratio; SII – systemic immune inflammation index, SIRI, systemic inflammatory response index) were determined as based on the results of GBC performed using automated hematology analyzers in 43 patients with RA (55.8% males; aged 22 to 78 years; 88% with high disease activity) twice (at admission to hospitalization and at discharge). The average length of hospitalization was 14 [9;14] days. Common inflammatory markers (ESR and CRP) correlated with each other ($r_s = 0.64$), i.e., we have found correlations between CRP and leukocyte counts ($r_s = 0.47$), with PLR ($r_s = 0.43$), and age of patients ($r_s = 0.34$), as well as correlations of ESR with PLR ($r_s = 0.37$) and age of RA patients ($r_s = 0.33$). The SII index correlated strongly with NLR ($r_s = 0.85$) and PLR ($r_s = 0.86$), moderately with MLR ($r_s = 0.49$), but not with SIRI ($p > 0.05$). The SIRI index showed a correlation with DAS-28 degree ($\beta = -0.072$, $p = 0.008$). Markers obtained from GBC were not associated with age or sex of the examined individuals (except of SIRI, $p = 0.027$), no intergroup differences in the studied hematologic markers were found when classifying RA patients by the content of antibodies to cyclic citrullinated peptide, presence of erosions and systemic manifestations (except of PLR, $p = 0.048$). Only CRP and systemic immune inflammation index (SII) showed a significant decrease ($p = 0.24$ and $p = 0.43$, respectively) during hospitalization of patients with RA. No advantage was found for usage of two-component indices (NLR, MLR, PLR) as plausible tools, both for assessing inflammatory status and for management of patients with highly active RA. The SII index, combining the prognostic value of three parameters (platelets, neutrophils and lymphocytes), may be considered not only

more powerful for predicting inflammation than single- or two-component hematologic markers, but also a valuable tool for monitoring inflammation and RA progression. Thus, the SII index (along with CRP) may be considered a potential biomarker for determining the outcome of inpatient treatment of patients with highly active RA.

Keywords: rheumatoid arthritis, disease activity, DAS28, the systemic immuno-inflammatory index, C-reactive protein, ESR

Введение

Ревматоидный артрит (РА) — хроническое аутоиммунное заболевание с глобальной распространенностью до 1%, проявляющееся в любом возрасте или на любом этапе жизни и сопровождающееся воспалением и разрушением суставных структур, при этом генетические, эпигенетические и экологические переменные способствуют развитию заболевания [2]. Патопизиология РА характеризуется сложным взаимодействием многих клеток, включая лейкоциты, синовиальные фибробласты, хондроциты и остеокласты, что приводит к нарушению иммунологического гомеостаза [3]. Хотя точные механизмы, лежащие в основе патофизиологического процесса РА, остаются неизвестными, все больше научных данных свидетельствуют о том, что иммуноопосредованное воспаление играет решающую роль в возникновении и прогрессировании РА [4]. Исследование А. Dervisevic и соавт. показало, что системное воспаление при РА связано с изменениями как в количестве, так и в составе циркулирующих воспалительных клеток крови, таких как нейтрофилы и лимфоциты [5].

Точный мониторинг интенсивности воспаления и статуса заболевания у пациентов с РА важен в условиях стационарного наблюдения. Использование простых и количественно определяемых маркеров системного воспалительного ответа позволяет более эффективно, быстро и всесторонне оценивать патологические процессы при РА. В последние годы пополнить немногочисленный список неинвазивных и экономически эффективных биомаркеров для использования при различных воспалительных и аутоиммунных заболеваниях предлагается за счет индексов, полученных из общего анализа крови (ОАК), таких как соотношение нейтрофилов и лимфоцитов (NLR), соотношение моноцитов и лимфоцитов (MLR), соотношение тромбоцитов и лимфоцитов (PLR), индекс системного иммунного воспаления (systemic immune-inflammation index, SII) и индекс системной воспалительной реакции (system inflammation response index, SIRI). В ряде работ был продемонстрирован потенциал данных индексов для помощи в диагностическом процессе и демонстрации активности РА [1, 6, 7]. Хотя вышеупомянутые биомаркеры были из-

учены в различных диагностических контекстах, связанных с разграничением по активности РА, существует заметный пробел в исследованиях этих индексов относительно динамического наблюдения за пациентами с активным РА в условиях стационара.

Цель исследования — определение воспалительных индексов, полученных из ОАК, у пациентов с активным РА в процессе стационарного лечения и изучение связи данных индексов с клинико-лабораторными параметрами заболевания.

Материалы и методы

В рамках ретроспективного исследования были собраны данные клинико-лабораторного обследования 43 пациентов с РА (55,8% мужчин и 44,2% женщин) в возрасте от 22 до 78 лет преимущественно с высокой активностью заболевания (88%) и серопозитивных по IgM-ревматоидному фактору (90,1%), проходивших стационарное лечение в ревматологическом отделении ГУЗ «ГКБСМП № 25» (г. Волгоград) в период времени с июля по октябрь 2024 года.

Критериями включения в исследование были лица обоих полов в возрасте старше 18 лет, которые соответствовали диагностическим критериям РА, установленным ACR/EULAR (2010 г.). В исследование не включали больных с онкологическими, инфекционными и гематологическими заболеваниями, а также пациентов с хронической почечной недостаточностью и заболеваниями печени. Исследование было одобрено локальным комитетом по этике ФГБНУ «НИИ КиЭР им. А.Б. Зборовского» и проводилось по протоколу в соответствии с этическими принципам, установленным Хельсинкской декларацией (в редакции 2000 года). Письменное информированное согласие пациентов не требовалось, так как демографические, клинические и лабораторные данные были извлечены из медицинских карт и данное исследование не оказало влияния на последующее ведение пациентов.

Индекс DAS28-СОЭ (Disease Activity Score) был использован для оценки активности РА: у 12% определена умеренная активность заболевания (DAS-28 от 3,2 до 5,0), у 88% — высокая (DAS-28 более 5,1). Средние значения DAS28 составили $5,44 \pm 0,53$ балла (при минимальных

значениях 3,8 и максимальных — 7,45). По клинической стадии пациенты распределились следующим образом: ранняя — 9,3%, развернутая — 53,5%, поздняя — 37,2%. Системные проявления РА были отмечены в 49% случаев; наиболее распространенными внесуставными осложнениями были ревматоидный склерит (16,3%), ревматоидные узелки (14%) и мышечная гипотрофия со статико-динамическими нарушениями (9,3%).

Лабораторные измерения проводились на образцах крови (венозная кровь из локтевой вены утром натощак), полученных во время клинической оценки каждого пациента дважды (при поступлении на стационарное лечение и при выписке). Все лабораторные исследования проводились с использованием стандартизованных и автоматизированных процедур. Воспалительные биомаркеры, рекомендованные для оценки эффективности противовоспалительной терапии, — СОЭ и СРБ — измерялись с помощью метода Вестергрена и методом иммунонефелометрии соответственно. Анализ биомаркеров из ОАК включал определение количества лейкоцитов, количества нейтрофильных гранулоцитов (нейтрофильных гранулоцитов), количества лимфоцитов, количества моноцитов и количества тромбоцитов по данным, полученным с помощью автоматизированных гематологических анализаторов. Стандартными методами был произведен расчет и оценка NLR, PLR, MLR. Индекс SII рассчитывался как количество тромбоцитов $\times$ количество нейтрофилов / количество лимфоцитов. Индекс SIRI рассчитывался как количество нейтрофилов $\times$ количество моноцитов / количество лимфоцитов. Во время забора крови все пациенты принимали нестероидные противовоспалительные препараты, 55,8% принимали глюкокортикостероиды, 81,4% лечились противоревматическими препаратами, модифицирующими течение заболевания, и 14% использовали генно-инженерные препараты.

Статистический анализ проведен с использованием пакета программ Statistica 10.0 (с предварительной проверкой количественных показателей на нормальность распределения). Оценка количественных признаков в связанных группах (независимо от вида распределения) предполагала использование теста Вилкоксона, в несвязанных группах — U-критерия Манна–Уитни (U test). Корреляционный анализ проведен по Спирмену (r_s). Регрессионный анализ выполнен для оценки коэффициентов уравнений нелинейной зависимости. Нормально распределенные данные представлены в виде средних величин и их стандартной ошибки ($M \pm m$), ненормально распределенные данные — в виде медианы (Me)

и межквартильного размаха ($Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$). Уровень значимости считали достоверным при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Воспалительные изменения при аутоиммунных заболеваниях подразумевают изменения количества, формы и размера клеток периферической крови, следовательно, по различным параметрам, полученным из клинического анализа крови, таким как SII, SIRI, NLR, PLR и MLR, возможно судить о наличии воспаления и активности патологического процесса.

У больных РА при поступлении на стационарное лечение общепринятые маркеры воспаления (СОЭ и СРБ) коррелировали между собой ($r_s = 0,64$), также были обнаружены корреляции СРБ с количеством лейкоцитов ($r_s = 0,47$) и возрастом пациентов ($r_s = 0,34$), СОЭ с возрастом больных РА ($r_s = 0,33$). Из всех изучаемых индексов только PLR достоверно коррелировал с СОЭ ($r_s = 0,37$) и СРБ ($r_s = 0,43$). NLR имел отрицательную связь с индексом DAS-28 ($r_s = -0,38$). SII сильно коррелировал с NLR ($r_s = 0,85$) и PLR ($r_s = 0,86$), умеренно с MLR ($r_s = 0,49$), но не с SIRI ($p > 0,05$). Также была обнаружена умеренная корреляция между SIRI и NLR ($r_s = 0,47$), SIRI и MLR ($r_s = 0,48$).

При обработке данных общего анализа крови пациентов после стационарного лечения (при выписке) новые значения изучаемых индексов продемонстрировали: сохранение на одном уровне связи SII с NLR ($r_s = 0,80$) и PLR ($r_s = 0,82$), при уменьшении силы связи с исходными показателями (для NLR $r_s = 0,34$, для PLR $r_s = 0,53$); усиление связи между SIRI и MLR ($r_s = 0,85$); индекс NLR достоверно коррелировал со всеми другими индексами (r_s от 0,31 до 0,8). Показатели общепринятых маркеров воспаления (СОЭ и СРБ), полученные на данном этапе, не коррелировали с изучаемыми индексами (кроме выявленной связи между СРБ и MLR, $r_s = 0,38$). Связь СРБ и СОЭ с возрастом сохранялась ($r_s = 0,31$ и $r_s = 0,46$ соответственно), а все индексы, полученные из ОАК, не зависели от возраста пациентов ($p > 0,05$).

В повседневной практике наиболее часто используемыми маркерами для оценки эффективности проводимой терапии при РА являются СОЭ и СРБ. Подразумевается, что идеальный диагностический маркер для этой цели должен быть простым, неинвазивным, легкодоступным, недорогим и точным. СРБ, соответствуя большинству данных характеристик, с успехом используется для оценки системного воспаления при РА; повышенные уровни СРБ указывают на более высокую степень активности заболевания, которую

также можно оценить и подтвердить с помощью компонентов индекса DAS28 [8]. Нами была продемонстрирована связь СРБ и СОЭ с возрастом пациентов с высокоактивным РА, находящихся на стационарном лечении, в то время как маркеры, полученные из ОАК, не были связаны ни с возрастом, ни с полом обследованных лиц (за исключением SIRI: у мужчин индекс выше, чем у женщин; U test, $p = 0,027$). Также не было обнаружено межгрупповых различий в исследуемых гематологических маркерах при разделении больных РА по содержанию антител к циклическому цитруллинированному пептиду, наличию эрозий и системных проявлений (за исключением PLR: при наличии системных проявлений – 0,69 (0,28-0,77), без системных проявлений 0,91 (0,58-1,54); U test, $p = 0,048$).

Далее были проанализированы различия в результатах лабораторных исследований, полученные при поступлении пациентов с РА на стационарное лечение и при выписке. Средний срок нахождения пациентов в стационаре составил 14 (9-14) дней. Из всех рассмотренных показателей только СРБ и индекс системного иммунного воспаления (SII) продемонстрировали достоверное снижение ($p = 0,24$ и $p = 0,43$ соответственно).

Исходные параметры, а также результаты лабораторных исследований по завершению стационарного лечения пациентов с РА представлены в таблице 1.

Принимая во внимание, что пациенты, находящиеся на лечении в стационаре, имели высокие показатели клинического индекса активности заболевания ($CDAI \geq 14$ у всех пациентов) для оценки возможного влияния активности РА (по индексу DAS-28) на гематологические маркеры был выполнен регрессионный анализ с оценкой коэффициентов уравнений нелинейной зависимости. Для большинства исследуемых параметров не было установлено значимой связи с индексом активности DAS-28 ($p > 0,05$), но интересным моментом стало обнаружение степенной зависимости между DAS-28 и SIRI ($\beta = -0,072$, $p = 0,008$). Следовательно, на основании высоко значимых искоемых коэффициентов можно составить степенное уравнение $DAS-28 = 7,95 \times [SIRI]^{-0,072}$ и по значениям SIRI достоверно предсказать значение DAS-28 в группе с высокоактивным РА.

Воспалительные процессы, наряду с нарушением регуляции иммунитета, играют решающую роль в возникновении, развитии и прогрессировании РА [9]. Однако нет единого мнения относи-

ТАБЛИЦА 1. ИСХОДНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ И РЕЗУЛЬТАТЫ ЛАБОРАТОРНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ ПРИ ВЫПИСКЕ ИЗ СТАЦИОНАРА, НАБЛЮДАЕМЫЕ У БОЛЬНЫХ РА

TABLE 1. BASELINE CHARACTERISTICS AND LABORATORY TEST RESULTS AT HOSPITAL DISCHARGE OBSERVED IN PATIENTS WITH RA

Переменные Variables	До лечения Before treatment	После лечения After treatment	р-значение p-value
СОЭ (мм/ч) ESR (mm/h)	32,1±22,0	28,5±16,6	0,081
СРБ (г/л) CRP (g/L)	8,1 (3,3-17,7)	6,3 (2,7-11,7)*	0,024
SII	611 (382-929)	458 (326-710)*	0,043
SIRI	199 (152-257)	205 (144-357)	0,611
NLR	2,19 (1,5-2,5)	1,92 (1,3-2,5)	0,136
PLR	0,77 (0,5-1,3)	0,62 (0,4-0,8)	0,195
MLR	0,25 (0,2-0,3)	0,27 (0,2-0,4)	0,264

Примечание. СРБ – С-реактивный белок, СОЭ – скорость оседания эритроцитов, SII – системный воспалительный индекс, SIRI – системный индекс воспалительной реакции, NLR – соотношение нейтрофилов и лимфоцитов, PLR – соотношение тромбоцитов и лимфоцитов, MLR – соотношение моноцитов и лимфоцитов. * – статистически значимые различия между группами.

Note. CRP, C-reactive protein; ESR, erythrocyte sedimentation rate; SII, systemic inflammatory index; SIRI, systemic inflammatory response index; NLR, neutrophil-to-lymphocyte ratio; PLR, platelet-to-lymphocyte ratio; MLR, monocyte-to-lymphocyte ratio.

*, statistically significant differences between groups.

тельно определенных гематологических биомаркеров, которые можно использовать для оценки воспалительного ответа при РА в динамике. В отличие от представленных ранее данных о тесной связи NLR и MLR с СОЭ и СРБ при большинстве ревматических заболеваний (РЗ) [10], мы не обнаружили преимуществ в использовании простых двухкомпонентных индексов (NLR, MLR, PLR) в качестве полезных инструментов как для оценки воспалительного статуса, так и при ведении пациентов с высокоактивным РА. Сложные воспалительные индексы, по всей вероятности, способны лучше отражать системный воспалительный статус, чем стандартные гематологические маркеры по отдельности [11]. Как показали результаты нашего исследования, индекс SII, основанный на трех типах периферических иммунных и воспалительных клеток (тромбоциты, нейтрофилы и лимфоциты), может быть рассмотрен в качестве дополнительного (к определению СРБ) маркера при оценке эффективности терапевтических вмешательств в условиях стационара. У пациентов с высокоактивным РА данный индекс не был связан ни с возрастом (в отличие от СОЭ и СРБ), ни с полом (в отличие от SIRI), ни с наличием системных (внесуставных) проявлений (в отличие от PLR), а клеточные компоненты, составляющие SII, даже по отдельности проявляли связь с активностью воспалительной реакции: количество тромбоцитов достоверно коррелировало с СОЭ ($r_s = 0,403$), лимфоциты слабо коррелировали с СРБ ($r_s = 0,33$, $p = 0,05$), нейтрофилы имели отрицательную связь с обоими воспалительными маркерами (для СОЭ $r_s = -0,37$, для СРБ $r_s = -0,43$), методом регрессионного анализа была определена достоверная связь количества нейтрофилов с DAS-28 ($\beta = -0,067$, $p = 0,026$).

Роль нейтрофилов при различных РЗ обсуждалась ранее, а NLR (соотношение нейтрофилов к лимфоцитам) предлагался в качестве воспалительного маркера [10]. Известно, что нейтрофилы демонстрируют самую высокую цитотоксическую способность среди различных типов клеток, вовлеченных в патологию РА. Нейтрофилы, присутствующие в кровотоке пациентов с РА, предварительно активированы для генерации активных форм кислорода [12]. Но у пациентов с активным РА, по-видимому, не только дисбаланс между нейтрофилами и лимфоцитами способен характеризовать связь с воспалением, но и третий компонент индекса SII — количество тромбоцитов — делает этот индекс оптимальным для использования у данной категории лиц. Снижение лейкоцитов и лимфоцитов регистрируется при многих РЗ, особенно при системной красной волчанке, и значительное увеличение NLR

может быть в основном связано с лимфоцитопенией [10]. У больных РА изменениями количества лимфоцитов невозможно объяснить особые характеристики SII, представленные в нашем исследовании, так как этот показатель является знаменателем во всех рассматриваемых индексах. Кроме того, проведенный поиск межгрупповых различий у пациентов (9,3%) с лимфоцитопенией (лимфоцитов в лейкоцитарной формуле $< 18\%$) и пациентов с нормальным процентным содержанием лимфоцитов (норма 20-40% в лейкоцитарной формуле) не выявил никаких статистически значимых закономерностей по всем изучаемым маркерам ($p > 0,05$).

На сегодняшний день индекс SII уже использовался при различных клинических состояниях, где воспаление является ключевым фактором [13]. Повышенные уровни SII предполагают усиленный иммунный ответ, который может влиять на механизмы, лежащие в основе развития и прогрессирования РА. Учитывая потенциальную диагностическую полезность SII, обсуждается возможность его использования для оценки клинической тяжести РА [14], однако следует иметь в виду, что чувствительность SII в выявлении ремиссии заболевания ограничена.

Таким образом, индекс SII объединяет прогностическое значение трех параметров циркулирующих воспалительных клеток крови из ОАК, может считаться не только более мощным для прогнозирования воспаления, чем однокомпонентные или двухкомпонентные воспалительные маркеры, но и быть ценным инструментом для мониторинга воспаления и прогрессирования заболевания у пациентов с высокоактивным РА во время пребывания в стационаре. Практическое использование расчетного индекса SII не несет дополнительных затрат и не добавляет специальных технических требований, следовательно перспективы его использования в качестве дополнительного воспалительного индекса для оценки состояния пациентов с РА обнадеживают.

В заключение следует отметить, что на данном этапе не представлялось возможным оценить прогностический потенциал используемых индексов для ответа на лечение у пациентов, использовавших различные виды терапевтического воздействия. Но полученные ранее противоречивые результаты других исследований свидетельствуют о том, что прогностическая ценность различных биомаркеров, полученных из ОАК, может быть контекстно-специфической и зависеть от вида проводимой терапии и конкретных схем лечения, что подчеркивает необходимость дальнейшего изучения и подтверждения полезности их применения.

Выводы

Индекс SII может быть востребован в качестве потенциального биомаркера для определения результатов стационарного лечения пациентов с РА. Несмотря на простоту и доступность мар-

керов, полученных из общего анализа крови, практические врачи пока еще крайне редко используют их при изучении гемограмм, возможно, потому, что они не знакомы в полной мере с возможностью практического применения данных индексов при конкретных заболеваниях.

Список литературы / References

1. Муравьев Ю.В., Глухова С.И., Лебедева В.В. Способ оптимизации оценки степени активности ревматоидного артрита // Клиническая фармакология и терапия, 2022. Т. 31, № 1. С. 39-42. [Muravyov Yu.V., Glukhova S.I., Lebedeva V.V. A method for optimizing the assessment of the activity of rheumatoid arthritis. *Klinicheskaya farmakologiya i terapiya = Clinical Pharmacology and Therapy*, 2022, Vol. 31, no. 1, pp. 39-42. (In Russ.)]
2. Giannini D., Antonucci M., Petrelli F., Bilia S., Alunno A., Puxeddu I. One year in review 2020: pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Clin. Exp. Rheumatol.*, 2020, Vol. 38, no. 3, pp. 387-397.
3. Firestein G.S., McInnes I.B. Immunopathogenesis of rheumatoid arthritis. *Immunity*, 2017, Vol. 46, pp. 183-196.
4. Smolen J.S., Aletaha D., McInnes I.B. Rheumatoid arthritis. *Lancet*, 2016, Vol. 388, no. 10055, pp. 2023-2038.
5. Dervisevic A., Fajkic A., Jahic E., Dervisevic L., Ajanovic Z., Ademovic E., Zaciragic A. Systemic immune-inflammation index in evaluation of inflammation in rheumatoid arthritis patients. *Medeni. Med. J.*, 2024, Vol. 39, no. 3, pp. 183-191.
6. Satis S. New inflammatory marker associated with disease activity in rheumatoid arthritis: the systemic immune-inflammation index. *Curr. Health Sci. J.*, 2021, Vol. 47, pp. 553-557.
7. Xu Y., He H., Zang Y., Yu Z., Hu H., Cui J., Wang W., Gao Y., Wei H., Wang Z. Systemic inflammation response index (SIRI) as a novel biomarker in patients with rheumatoid arthritis: a multi-center retrospective study. *Clin. Rheumatol.*, 2022, Vol. 41, no. 7, pp. 1989-2000.
8. Pope J.E., Choy E.H. C-reactive protein and implications in rheumatoid arthritis and associated comorbidities. *Semin. Arthritis Rheum.*, 2021, Vol. 51, pp. 219-229.
9. Edilova M.I., Akram A., Abdul-Sater A.A. Innate immunity drives pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Biomed. J.*, 2021, Vol. 44, no. 2, pp. 172-182.
10. Yang Z., Zhang Z., Lin F., Ren Y., Liu D., Zhong R., Liang Y. Comparisons of neutrophil-, monocyte-, eosinophil-, and basophil- lymphocyte ratios among various systemic autoimmune rheumatic diseases. *APMIS*, 2017, Vol. 125, no. 10, pp. 863-871.
11. Zhang Y., Chen Z., Jin F. The value of the systemic immune-inflammation index in predicting survival outcomes in patients with brain metastases of non-small-cell lung cancer treated with stereotactic radiotherapy. *Mediators Inflamm.*, 2021, Vol. 2021, 2910892. doi: 10.1155/2021/2910892.
12. Zhang L., Yuan Y., Xu Q., Jiang Z., Chu C.Q. Contribution of neutrophils in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *J. Biomed. Res.*, 2019, Vol. 34, pp. 86-93.
13. Xie Y., Zhuang T., Ping Y. Elevated systemic immune inflammation index level is associated with disease activity in ulcerative colitis patients. *Clin. Chim. Acta.*, 2021, Vol. 517, pp. 122-126.
14. Choe J.Y., Lee C.U., Kim S.K. Association between novel hematological indices and measures of disease activity in patients with rheumatoid arthritis. *Medicina (Kaunas)*, 2023, Vol. 59, no. 1, 117. doi: 10.3390/medicina59010117.

Авторы:

Александров В.А. — ассистент кафедры госпитальной терапии ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ; младший научный сотрудник, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной ревматологии имени А.Б. Зборовского», г. Волгоград, Россия

Емельянов Н.И. — к.м.н., доцент кафедры госпитальной терапии ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Волгоград, Россия

Authors:

Aleksandrov V.A., Assistant Professor, Department of Hospital Therapy, Volgograd State Medical University; Junior Research Associate, A. Zborovsky Research Institute of Clinical and Experimental Rheumatology, Volgograd, Russian Federation

Emelyanov N.I., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Hospital Therapy, Volgograd State Medical University, Volgograd, Russian Federation

Александров А.В. — д.м.н., доцент, профессор кафедры клинической лабораторной диагностики ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ; заведующий лабораторией функциональных методов исследования, ультразвуковой диагностики и восстановительной терапии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной ревматологии имени А.Б. Зборовского», г. Волгоград, Россия

Зборовская И.А. — д.м.н., профессор, директор ФГБНУ «Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной ревматологии имени А.Б. Зборовского», г. Волгоград, Россия

Aleksandrov A.V., PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Professor, Department of Clinical Laboratory Diagnostics, Volgograd State Medical University; Head, Laboratory of Functional Research Methods, Ultrasound Diagnostics and Rehabilitation Therapy, A. Zborovsky Research Institute of Clinical and Experimental Rheumatology, Volgograd, Russian Federation

Zborovskaya I.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Director, A. Zborovsky Research Institute of Clinical and Experimental Rheumatology, Volgograd, Russian Federation of Health and Medicine, Berlin, Germany

Поступила 14.03.2025
Отправлена на доработку 09.05.2025
Принята к печати 25.05.2025

Received 14.03.2025
Revision received 09.05.2025
Accepted 25.05.2025

ГУМОРАЛЬНЫЙ ИММУНИТЕТ К *C. KEFIRRESIDENTII* И *S. EPIDERMIDIS* – КОМПОНЕНТАМ ПАТОБИОТЫ ТУБЕРКУЛЕЗНЫХ ОЧАГОВ

Орлова Е.А., Огарков О.Б., Колесникова Л.И.

ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека», г. Иркутск, Россия

Резюме. Роль микробиоты легких при туберкулезе привлекает все больше внимания, особенно в контексте взаимодействия с иммунной системой и поддержания системного хронического воспаления. Микроорганизмы, входящие в состав локальной микробной среды туберкулезных очагов, могут не только формировать специфические иммунные сигналы, но и участвовать в иммунопатогенезе инфекции за счет перекрестных взаимодействий с иммунной системой хозяина. В рамках ранее проведенного масштабного микробиологического скрининга факультативно-анаэробной микробиоты туберкулезных очагов нами были выделены два бактериальных штамма — *Corynebacterium kefirresidentii* и *Staphylococcus epidermidis*, обнаруженные в казеозном содержимом туберкулем. С учетом их микробиологических и биохимических характеристик, а также выявленной устойчивости к ряду противотуберкулезных препаратов, эти микроорганизмы рассматриваются как элементы патобиоты, способные участвовать в поддержании локального воспалительного процесса при туберкулезе. Клеточные лизаты данных микроорганизмов применялись в качестве источников потенциальных антигенов для оценки иммунного ответа. В настоящем исследовании был разработан и апробирован лабораторный подход для сравнительной оценки гуморального иммунного ответа к компонентам неспецифической микробиоты туберкулезного очага. Анализ проводился методом полуколичественного иммуноферментного анализа с использованием образцов сыворотки крови пациентов с ТБ легких ($n = 90$) и здоровых доноров ($n = 90$). Серопревалентность и уровень специфических IgG к *C. kefirresidentii* оказались достоверно выше у пациентов с туберкулезом по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05$), что может свидетельствовать о вовлеченности данного микроорганизма в иммунопатогенез заболевания. Напротив, для *S. epidermidis* статистически значимых различий между группами не выявлено, что, вероятно, связано с его широкой популяционной распространенностью как кожного комменсала. При этом значение иммунного ответа к *S. epidermidis* в контексте туберкулеза ранее практически не рассматривалось, хотя существуют данные о роли отдельных штаммов данного вида в патогенезе распространенных дерматологических заболеваний. Обнаруженная положительная корреляция между уровнями антител к обоим микроорганизмам, характерная только для пациентов с туберкулезом ($p = 0,001$), может свидетельствовать о патологическом характере иммунного взаимодействия при

Адрес для переписки:

Орлова Елизавета Андреевна
ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи
и репродукции человека»
664003, Россия, г. Иркутск, ул. Тимирязева, 16.
Тел./факс: 8 (3952) 20-76-36.
E-mail: elizaveta.a.orlova@gmail.com

Address for correspondence:

Elizaveta A. Orlova
Scientific Center for Family Health
and Human Reproduction Problems
16 Timiryazev St
Irkutsk
664003 Russian Federation
Phone/fax: +7 (3952) 20-76-36.
E-mail: elizaveta.a.orlova@gmail.com

Образец цитирования:

Е.А. Орлова, О.Б. Огарков, Л.И. Колесникова
«Гуморальный иммунитет к *C. kefirresidentii*
и *S. epidermidis* — компонентам патобиоты
туберкулезных очагов» // Российский
иммунологический журнал, 2025. Т. 28, № 3. С. 773–778.
doi: 10.46235/1028-7221-17280-HIR

© Орлова Е.А. и соавт., 2025
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

E.A. Orlova, O.B. Ogarkov, L.I. Kolesnikova “Humoral
immune response to *C. kefirresidentii* and *S. epidermidis* as
pathobiotic components of tuberculosis foci”, *Russian Journal
of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal*, 2025,
Vol. 28, no. 3, pp. 773–778.
doi: 10.46235/1028-7221-17280-HIR

© Orlova E.A. et al., 2025
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.46235/1028-7221-17280-HIR

туберкулезе легких. Полученные результаты подчеркивают значимость изучения гуморального ответа к микробиотным компонентам в контексте туберкулеза и расширяют представления об иммунных механизмах, сопровождающих инфекционный процесс.

Ключевые слова: гуморальный иммунитет, туберкулез, микробиота легких, *Corynebacterium kefirresidentii*, *Staphylococcus epidermidis*

HUMORAL IMMUNE RESPONSE TO *C. KEFIRRESIDENTII* AND *S. EPIDERMIDIS* AS PATHOBIOTIC COMPONENTS OF TUBERCULOSIS FOCI

Orlova E.A., Ogarkov O.B., Kolesnikova L.I.

Scientific Center for Family Health and Human Reproduction Problems, Irkutsk, Russian Federation

Abstract. The role of lung microbiota in tuberculosis has attracted increasing attention, particularly in the context of its interaction with the immune system and its contribution to systemic chronic inflammation. Microorganisms constituting the local microbial environment of tuberculosis lesions may not only generate specific immune signals but also participate in the immunopathogenesis of infection through cross-interactions with the host immune system. In a previously conducted large-scale microbiological screening of facultative anaerobic microbiota in tuberculosis lesions, we isolated two bacterial strains — *Corynebacterium kefirresidentii* and *Staphylococcus epidermidis* — from the caseous material of tuberculomas. Based on their microbiological and biochemical characteristics, as well as identified resistance to several first-line antituberculosis drugs, these microorganisms are considered elements of the pathobiota that may contribute to the maintenance of local inflammation in tuberculosis. Cell lysates of these microorganisms were used as sources of potential antigens to assess immune responses. In the present study, a laboratory approach was developed and tested to comparatively evaluate the humoral immune response to components of nonspecific microbiota associated with tuberculosis lesions. The analysis was carried out using a semi-quantitative ELISA with blood serum samples obtained from patients with pulmonary tuberculosis ($n = 90$) and healthy donors ($n = 90$). Seroprevalence and levels of specific IgG against *C. kefirresidentii* were significantly higher in tuberculosis patients compared to the control group ($p < 0.05$), suggesting a possible involvement of this microorganism in the immunopathogenesis of the disease. In contrast, no statistically significant differences were observed between groups for *S. epidermidis*, which is likely related to its high prevalence in the general population as a common skin commensal. Although the role of immune responses to *S. epidermidis* in tuberculosis has not been previously considered, some studies indicate the involvement of certain strains in the pathogenesis of common dermatological disorders. A positive correlation between antibody levels to both microorganisms, observed only in tuberculosis patients ($p = 0.001$), may indicate a pathological nature of immune interactions in pulmonary tuberculosis. These findings highlight the importance of evaluating humoral responses to microbiota components in the context of tuberculosis and expand our understanding of immune mechanisms accompanying this infectious process.

Keywords: humoral immunity, tuberculosis, lung microbiota, *Corynebacterium kefirresidentii*, *Staphylococcus epidermidis*

Работа выполнена в рамках фундаментального научного исследования ФГБНУ НЦ ПЗСРЧ № 121022500179-0.

Введение

Гуморальный иммунитет при туберкулезе (ТБ) длительное время считался малозначимым, поскольку *Mycobacterium tuberculosis* является облигатным внутриклеточным патогеном. Однако бо-

лее поздние исследования продемонстрировали участие антител в защите от инфекции [7, 9]. Иммунный ответ может также модифицироваться под влиянием неспецифических микроорганизмов, способных вызывать и поддерживать хроническое воспаление в легочной ткани [8]. На этом фоне сателлитная микробиота казеозных очагов в пораженных легких рассматривается как потенциально значимый, но недостаточно изученный фактор, влияющий на патогенез и иммунологи-

ческие особенности ТБ [3]. Известно, что микробиота кишечника модулирует гуморальный иммунный ответ при системных воспалительных заболеваниях [5, 11], однако данные о гуморальной иммуногенности легочной микробиоты при ТБ отсутствуют.

Ранее в рамках масштабного микробиологического скрининга факультативно-анаэробной микробиоты туберкулем нами были выделены два бактериальных штамма — *Corynebacterium kefirresidentii* и *Staphylococcus epidermidis* [2, 4]. С учетом их микробиологических и биохимических характеристик, а также устойчивости к некоторым противотуберкулезным препаратам, данные микроорганизмы рассматриваются как элементы патобиоты, ассоциированной с локальным воспалением при ТБ.

Целью настоящего исследования стал анализ гуморального иммунного ответа у пациентов с ТБ и здоровых доноров к бактериальным антигенам — клеточным лизатам *C. kefirresidentii* и *S. epidermidis*.

Материалы и методы

Исследование одобрено локальным этическим комитетом ФГБНУ НЦ ПЗСРЧ (протокол № 4 от 16.11.2020). Все участники подписали информированное согласие.

Микробиологические штаммы *C. kefirresidentii* и *S. epidermidis* получены ранее из образцов казеозного некроза от пациентов с ТБ и идентифицированы полногеномным секвенированием [2, 4]. Оба штамма демонстрировали ограниченную устойчивость к антимикобактериальным препаратам первого ряда и обладали характерной ферментативной активностью (липазной — *C. kefirresidentii*, уреазной и желатиназной — *S. epidermidis*). Для культивирования микроорганизмов использовали среды LB (Difco, США), VHI Broth (HiMedia, Индия) и Nutrient Broth (Merck, Германия), дополненные 0,1% Tween-80. К 100 мл питательной среды добавляли 1 мл предварительно подготовленных культур и инкубировали при 37 °С в течение ночи с аэрацией при 250 об/мин. Клетки дважды промывали в PBS и подвергали лизису. Для получения клеточных лизатов из-за низкой эффективности стандартного протокола с лизоцимом, подтвержденного методом Брэдфорд и профилем белков при электрофорезе в ПААГ, применяли механическое разрушение клеток в PBS размольными шарами диаметром 0,1 и 0,5 мм из набора ZR BashingBead Lysis Tubes (ZymoResearch, США). Максимальный выход и разнообразие белкового профиля были достигнуты при культивировании *C. kefirresidentii* на VHI Broth и *S. epidermidis* на Nutrient Broth. Клеточные лизаты очищали цен-

трифугированием и фильтрацией через 0,22 мкм бактериальные фильтры, концентрацию белков определяли методом Брэдфорд и выравняли до 1 мг/мл. Полученные лизаты применялись как смеси потенциальных антигенов.

Для оценки гуморального иммунитета в исследование были включены две скрининговые группы без ограничения по полу и возрасту: пациенты с ТБ (n = 90) и здоровые добровольцы (n = 90), не имевшие в анамнезе ТБ или других хронических инфекций. В каждой группе были собраны по 4 парных образца с интервалом не менее 2 месяцев. Кровь центрифугировали, сыворотку отбирали и хранили при -80 °С до момента проведения лабораторного анализа.

Для полуколичественной оценки продукции IgG в ответ на бактериальные антигены штаммов *C. kefirresidentii* и *S. epidermidis* использовали метод иммуноферментного анализа (ИФА). 100 мкл клеточных лизатов наносили в лунки планшета в буфере NaHCO₃ (0,1 М) и инкубировали при 4 °С на протяжении ночи для сорбции. Блокировка проводилась 10% раствором БСА (37 °С, 1 ч, 500 об/мин). ИФА проводили согласно протоколу тест-системы (Вектор-Бест, Россия). Для подбора оптимальных условий тестирования было проведено титрование антигенов (37,5–2400 нг/лунку) и сыворотки крови (разведение от 1:12,5 до 1:800) с использованием пулированной сыворотки крови.

Для определения пороговых значений оптической плотности (ОП) использовался алгоритм change-point анализа, основанный на методике, предложенной F. Lardeux и соавт. [6]. Этот метод позволяет объективно разделить распределение значений сигнала ОП на зоны, соответствующие отрицательной, пограничной и положительной реакции. В отличие от классических подходов, где порог задается эмпирически, change-point анализ использует статистические критерии для определения точек излома — значимых изменений в структуре распределения данных. Алгоритм предполагает ранжирование всех значений ОП по возрастанию, после чего оценивается вероятность того, что данные можно разбить на сегменты с разной средней величиной. Оптимальное разбиение определяется на основании максимизации апостериорной вероятности модели.

Таким образом, были сформированы три диапазона: значения ниже первой точки излома (отрицательные реакции), значения между первой и второй точками (неопределенные реакции), значения выше второй точки излома (положительные реакции). Анализ проводился в среде R с использованием пакета BEAST, как рекомендовано в оригинальной работе. Такой подход обеспечивает статистически обоснованную и воспроиз-

водимую интерпретацию результатов ИФА при отсутствии эталонных контрольных значений. Статистический анализ проводили с использованием χ^2 -критерия и U-критерия Манна–Уитни. Нормальность распределения оценивалась по критерию Шапиро–Уилка. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Для оптимизации условий проведения ИФА было проведено титрование антигенов *C. kefirresidentii* и *S. epidermidis* и сывороток с использованием пулированной сыворотки крови больных ТБ. Концентрация антигенов варьировалась от 37,5 до 2400 нг/лунку, разведение сывороток — от 1:12,5 до 1:800. На основании анализа кривых «ОП — концентрация» (рис. 1) были выбраны оптимальные условия: концентрация антигенов 200 нг/лунку и разведение сыворотки 1:50, обеспечивающие линейность сигнала и оптимальное соотношение «сигнал/шум». Полученные параметры были использованы при последующем анализе индивидуальных образцов.

Для каждого исследуемого антигена (*C. kefirresidentii* и *S. epidermidis*) были определены следующие показатели: доля серопозитивных пациентов (серопревалентность), среднее значение ОП для всех образцов и среднее ОП среди серопозитивных образцов, а также статистические сравнения между группами здоровых доноров и больных ТБ (рис. 2).

В группе здоровых доноров при анализе реакции на лизат *C. kefirresidentii* средняя ОП по всем образцам составила 0,8 (0,5–1,2) о. е., в группе

больных — 1,0 (0,5–1,9) о. е. ($U = 3290$; $p = 0,029$). Применение change-point анализа позволило распределить образцы на серопозитивные, серонегативные и неопределенные («серая зона»). В группе здоровых доноров серопозитивными оказались 3 человека, серонегативными — 75 человек, серопревалентность составила $3,5 \pm 3,9\%$. Среди больных ТБ серопозитивны — 18 человек, серонегативны — 68, серопревалентность — $20 \pm 8,3\%$, что значимо отличается от здоровых доноров ($\chi^2 = 10,6$; $p = 0,001$). При отдельном анализе образцов, рассматриваемых как серопозитивные, средняя ОП была также выше у больных ТБ и составила $3,1 \pm 0,4$ о. е. по сравнению с $2,7 \pm 0,1$ о. е. у здоровых доноров ($U = 7$; $p = 0,049$). Таким образом, результаты демонстрируют значимо более высокую частоту позитивных IgG-реакций и уровень сигнала при исследовании *C. kefirresidentii* у пациентов с ТБ по сравнению со здоровыми донорами. До настоящего времени данных о гуморальном иммунном ответе к данному виду микроорганизмов в литературе представлено не было, что подчеркивает новизну полученных результатов. Наличие у больных ТБ антител к *C. kefirresidentii* позволяет предположить участие этого микроорганизма в формировании системного иммунного ответа и, потенциально, его диагностическую значимость как маркера локальной бактериальной инфекции.

При анализе реакции на лизат *S. epidermidis* средняя ОП по всем образцам составила 2,3 (1,2–3,3) о. е. у здоровых и 1,8 (0,9–3,2) о. е. у больных ТБ ($U = 3497$; $p = 0,1$). Согласно change-point

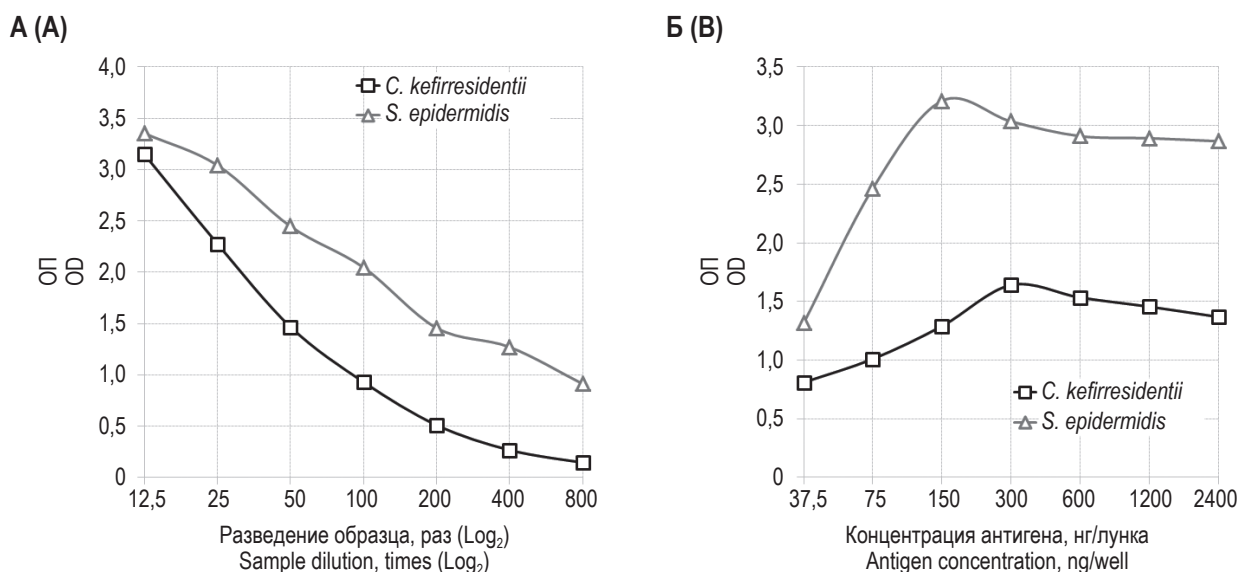
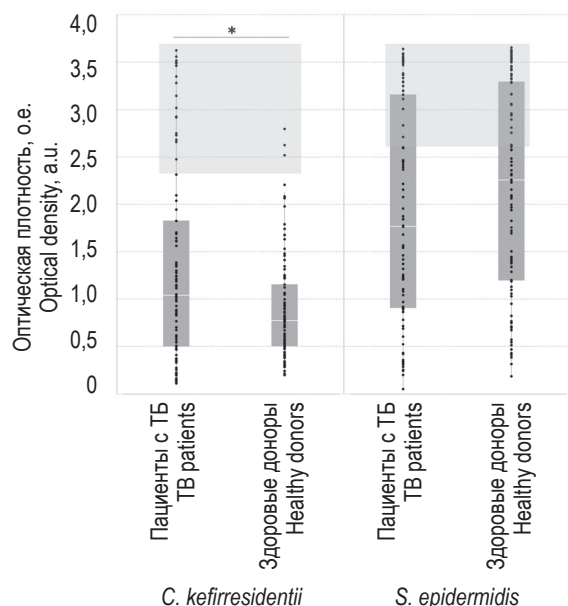


Рисунок 1. Оптимизация ИФА титрованием пулированной сыворотки крови больных туберкулезом (А) и лизатов *C. kefirresidentii* и *S. epidermidis* (Б)

Figure 1. Optimization of ELISA by titration of pooled blood serum from tuberculosis patients (A) and lysates of *C. kefirresidentii* and *S. epidermidis* (B)

А (A)



Б (B)

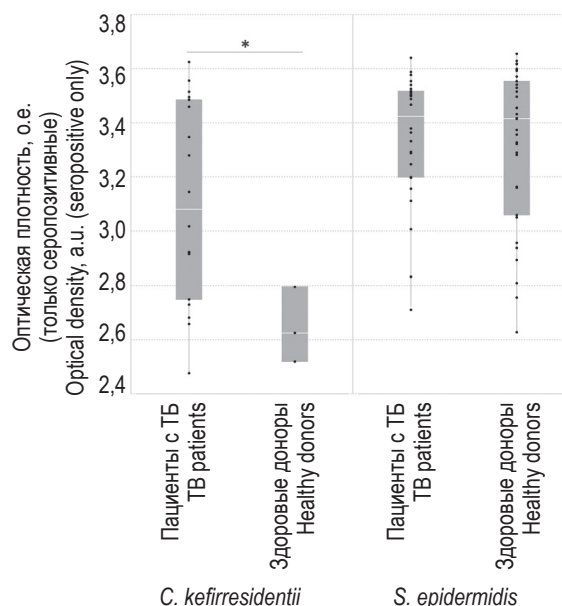


Рисунок 2. Различия серостатусов к лизатам *C. kefirresidentii* и *S. epidermidis*: все проанализированные образцы (A), светло-серой зоной обозначен диапазон ОП, соответствующий положительным реакциям по результатам change-point анализа, и только серопозитивные образцы (B)

Figure 2. Differences in serostatus to *C. kefirresidentii* and *S. epidermidis* lysates: all analyzed samples (A), with the light gray area indicating the optical density (OD) range classified as positive according to change-point analysis, and seropositive samples only (B)

анализу в группе здоровых доноров серопозитивными оказались 35 человек, серонегативными — 31 человек, серопревалентность — $38,9 \pm 10,1\%$. В группе больных ТБ серопозитивны — 28 человек, серонегативны — 44 человека, серопревалентность — $31,1 \pm 9,6\%$ ($\chi^2 = 2,2$; $p = 0,14$). Среди серопозитивных образцов среднее ОП было одинаковым в обеих группах: 3,4 (3,1–3,6) о. е. у доноров и 3,4 (3,2–3,5) о. е. у больных ($U = 487$; $p = 0,97$).

Помимо этого, у пациентов с ТБ, но не у здоровых доноров, обнаружена слабая положительная корреляция между уровнями IgG к антигенам *C. kefirresidentii* и *S. epidermidis* ($r_s = 0,3$, $p = 0,001$), которая может указывать на патологический характер иммунного взаимодействия при ТБ легких.

Полученные данные свидетельствуют о наличии гуморального иммунного ответа на компоненты *C. kefirresidentii* и *S. epidermidis* у значительной части больных ТБ. Особенно выражен ответ на *C. kefirresidentii*, что может быть связано с высокой антигенной нагрузкой или усилением воспаления в присутствии этого микроорганизма. Особенности клеточной стенки этих бактерий, включая наличие миколовых кислот (коринемиколов) и других липидных компонентов,

возможно, способствуют их длительной персистенции и устойчивости к иммунному контролю. Их участие в разжижении казеозного некроза и нарушении границ очага может способствовать прогрессированию инфекции.

Наличие ответа у части здоровых лиц на *S. epidermidis*, вероятно, связано с постоянным контактом с коагулазонегативными стафилококками на коже и слизистых [1]. Несмотря на свою комменсальную природу, *S. epidermidis* способен участвовать в патогенезе кожных заболеваний, включая атопический дерматит, благодаря способности к образованию биопленки и модуляции локального врожденного иммунного ответа [10].

Несмотря на полученные значимые результаты, ограничением исследования может быть возможная кросс-реактивность антител, поскольку применение клеточных лизатов может способствовать перекрестной реактивности с белками других представителей родов *Corynebacterium* и *Staphylococcus*, что необходимо учитывать при интерпретации полученных результатов.

Заключение

Проведенное исследование демонстрирует, что некоторые микроорганизмы, ассоцииро-

ванные с туберкулезными очагами, в частности *C. kefirresidentii*, способны вызывать специфический гуморальный иммунный ответ у больных

ТБ, что позволяет рассматривать антитела к ним как потенциальные иммуномаркеры патологического микробного взаимодействия.

Список литературы / References

1. Гульнева М.Ю. Особенности гуморального иммунного ответа на антигены оппортунистических микроорганизмов у больных системной красной волчанкой // Актуальные проблемы медицины, 2021. Т. 44, № 3. С. 278-285. [Gulneva M.Yu. Features of the humoral immune response to antigens of opportunistic microorganisms in patients with systemic lupus erythematosus. *Aktualnye problemy meditsiny = Challenges in Modern Medicine*, 2021, Vol. 44, no. 3, pp. 278-285. (In Russ.)]
2. Огарков О.Б., Суздальницкий А.Е., Кондратов И.Г., Букин Ю.С., Орлова Е.А., Синьков В.В., Жданова С.Н., Белькова Н.Л., Рычкова Л.В., Колесникова Л.И. Выделение и полногеномное секвенирование липофильной анаэробной бактерии, представителя видового комплекса *Corynebacterium tuberculo-stearicum*, из туберкулезного очага // Acta Biomedica Scientifica, 2023. Т. 8, № 4. С. 12-19. [Ogarkov O.B., Suzdalnitsky A.E., Kondratov I.G., Bukin Yu.S., Orlova E.A., Sinkov V.V., Zhdanova S.N., Belkova N.L., Rychkova L.V., Kolesnikova L.I. Isolation and whole genome sequencing of a lipophilic anaerobic bacterium, a representative of the species complex *Corynebacterium tuberculo-stearicum*, from a tuberculosis focus. *Acta Biomedica Scientifica = Acta Biomedica Scientifica*, 2023, Vol. 8, no. 4, pp. 12-19. (In Russ.)]
3. Орлова Е.А., Огарков О.Б., Колесникова Л.И. Особенности микробиоты легких при туберкулезной инфекции // Бюллетень сибирской медицины, 2024. Т. 23, № 1. С. 166-175. [Orlova E.A., Ogarkov O.B., Kolesnikova L.I. Features of the lung microbiota in tuberculosis infection. *Byulleten' sibirskoy meditsiny = Bulletin of Siberian Medicine*, 2024, Vol. 23, no. 1, pp. 166-175. (In Russ.)]
4. Синьков В.В., Орлова Е.А., Огарков О.Б., Суздальницкий А.Е., Кондратов И.Г., Белькова Н.Л., Рычкова Л.В. Геном *Staphylococcus epidermidis* из казеозного некроза туберкулемы // Генетика, 2024. Т. 60, № 10. С. 129-134. [Sinkov V.V., Orlova E.A., Ogarkov O.B., Suzdalnitsky A.E., Kondratov I.G., Belkova N.L., Rychkova L.V. The genome of *Staphylococcus epidermidis* isolated from Caseous Tuberculoma. *Genetika = Russian Journal of Genetic*, 2024, Vol. 60, no. 10, pp. 129-134. (In Russ.)]
5. Henriksson G., Bredberg J., Wullt M., Lyrenäs E., Hindorf U., Ohlsson B., Grip O. Humoral response to *Clostridium difficile* in inflammatory bowel disease, including correlation with immunomodulatory treatment. *JGH Open*, 2018, Vol. 3, no. 2, pp. 154-158.
6. Lardeux F., Torrico G., Aliaga C. Calculation of the ELISA's cut-off based on the change-point analysis method for detection of *Trypanosoma cruzi* infection in Bolivian dogs in the absence of controls. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 2016, Vol. 111, no. 8, pp. 501-504.
7. Matucci A., Maggi E., Vultaggio A. Cellular and humoral immune responses during tuberculosis infection: useful knowledge in the era of biological agents. *J. Rheumatol. Suppl.*, 2014, Vol. 91, pp. 17-23.
8. Ramírez-Labrada A.G., Isla D., Artal A., Arias M., Rezusta A., Pardo J., Gálvez E.M. The influence of lung microbiota on lung carcinogenesis, immunity, and immunotherapy. *Trends Cancer*, 2020, Vol. 6, no. 2, pp. 86-97.
9. Rijnink W.F., Ottenhoff T.H.M., Joosten S.A. B-cells and antibodies as contributors to effector immune responses in tuberculosis. *Front. Immunol.*, 2021, Vol. 12, 640168. doi: 10.3389/fimmu.2021.640168.
10. Severn M.M., Horswill A.R. *Staphylococcus epidermidis* and its dual lifestyle in skin health and infection. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2023, Vol. 21, no. 2, pp. 97-111.
11. Stoll M.L., Kumar R., Morrow C.D., Lefkowitz E.J., Cui X., Genin A., Cron R.Q., Elson C.O. Altered microbiota associated with abnormal humoral immune responses to commensal organisms in enthesitis-related arthritis. *Arthritis Res. Ther.*, 2014, Vol. 16, no. 1, 486. doi: 10.1186/s13075-014-0486-0.

Авторы:

Орлова Е.А. — к.б.н., младший научный сотрудник лаборатории эпидемиологически и социально значимых инфекций ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека», г. Иркутск, Россия

Огарков О.Б. — д.м.н., директор Института эпидемиологии и микробиологии ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека», г. Иркутск, Россия

Колесникова Л.И. — д.м.н., профессор РАН, академик РАН, научный руководитель ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека», г. Иркутск, Россия

Authors:

Orlova E.A., PhD (Biology), Junior Researcher, Laboratory of Epidemic and Social Infections, Scientific Center for Family Health and Human Reproduction Problems, Irkutsk, Russian Federation

Ogarkov O.B., PhD, MD (Medicine), Head, Institute of Epidemiology and Microbiology, Scientific Center for Family Health and Human Reproduction Problems, Irkutsk, Russian Federation

Kolesnikova L.I., PhD, MD (Medicine), Professor of the Russian Academy of Sciences, Full Member of the Russian Academy of Sciences, Scientific Supervisor, Scientific Center for Family Health and Human Reproduction Problems, Irkutsk, Russian Federation

Поступила 03.06.2025
Принята к печати 07.06.2025

Received 03.06.2025
Accepted 07.06.2025

МИОКИНОВЫЙ ПРОФИЛЬ КРОВИ ПРИ ТРАВМЕ ПЕРЕДНЕЙ КРЕСТООБРАЗНОЙ СВЯЗКИ КОЛЕННОГО СУСТАВА С НАЛИЧИЕМ ФЕНОМЕНА АРТРОГЕННОГО МЫШЕЧНОГО ТОРМОЖЕНИЯ

Ахметьянов Р.Р.^{1,2}, Сабирьянов А.Р.²

¹ ГБУЗ «Челябинская областная клиническая больница», г. Челябинск, Россия

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

Резюме. Артрогенное мышечное торможение — малоизученный феномен, сопровождающий от 30 до 50% всех травм капсульно-связочного аппарата коленного сустава. Изучение динамики уровней миокинов в крови после травмы с развитием артрогенного мышечного торможения, важно для понимания процессов восстановления структур двигательного сегмента. Цель — анализ направленности изменений содержания миокинов в периферической крови пациентов с артрогенным мышечным торможением (АМТ) вследствие травматического повреждения передней крестообразной связки (ПКС) коленного сустава. Наблюдались 58 мужчин, занимающихся аэробными видами спорта (легкая атлетика, плавание, баскетбол) с повреждением ПКС. Для выявления феномена АМТ проводилось электромиографическое (ЭМГ) исследование прямой головки четырехглавой мышцы бедра травмированной конечности на 4-канальной системе ЭМГ/ВП Viking Quest (Nicolet, США). Уровни миокинов в венозной крови определялись тест-системами для иммуноферментного анализа отечественного и зарубежного производства: IL-6 (АО «Вектор-Бест», г. Новосибирск); концентрация трансформирующего фактора роста — β , декорина, миостатина (фирма Cloud-Clone Corp. (China); VEGF (ЗАО «БиоХимМак»). Контрольную группу составили 12 здоровых мужчин, средний возраст $34,2 \pm 2,4$ года. Статистическая обработка материала проводилась при помощи пакета Statistica. vers. 10.0 (StatSoft Inc., США). У пациентов с травмой ПКС и наличием феномена АМТ установлено значимое снижение концентраций IL-6, трансформирующего фактора роста β и протеогликана — декорина в крови и повышение концентраций VEGF и MSTN, относящихся наряду с TGF- β к группе факторов роста. Снижение уровня IL-6, декорина и VEGF, вероятно, является следствием вынужденной гипокинезии при травме ПКС, а формирование АМТ может быть также следствием повышения

Адрес для переписки:

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

Address for correspondence:

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

Образец цитирования:

Р.Р. Ахметьянов, А.Р. Сабирьянов «Миокиновый профиль крови при травме передней крестообразной связки коленного сустава с наличием феномена артрогенного мышечного торможения» // Российский иммунологический журнал, 2025. Т. 28, № 3. С. 779–784. doi: 10.46235/1028-7221-17169-BMP

© Ахметьянов Р.Р., Сабирьянов А.Р., 2025
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

R.R. Akhmetyanov, A.R. Sabiryanov "Blood myokine profile in anterior cruciate ligament injury of the knee joint with arthrogenic muscle inhibition", Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2025, Vol. 28, no. 3, pp. 779–784. doi: 10.46235/1028-7221-17169-BMP

© Akhmetyanov R.R., Sabiryanov A.R., 2025
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.46235/1028-7221-17169-BMP

в крови миостатина, являющегося отрицательным регулятором миогенеза. Изменения концентрации миокинов в периферической крови при травматическом повреждении капсульно-связочного аппарата коленного сустава наглядно демонстрируют вовлеченность мышечного секретора в процессы травматического повреждения тканей и формирование феномена артрогенного мышечного торможения.

Ключевые слова: повреждение передней крестообразной связки, электромиография, цитокины, миокины, артрогенное мышечное торможение

BLOOD MYOKINE PROFILE IN ANTERIOR CRUCIATE LIGAMENT INJURY OF THE KNEE JOINT WITH ARTHROGENIC MUSCLE INHIBITION

Akhmetyanov R.R.^{a, b}, Sabiryanov A.R.^b

^a Chelyabinsk Regional Clinical Hospital, Chelyabinsk, Russian Federation

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

Abstract. Arthrogenic muscle inhibition is a poorly studied phenomenon that occurs in 30 to 50% of all capsular-ligamentous injuries in the knee joint. The study of the dynamics of myokine levels in the blood after the injury with development of arthrogenic muscle inhibition is important for understanding the processes of restoration of the motor segment structures. Objective of our study was to analyze the changes in blood myokine contents in patients with arthrogenic muscle inhibition (AMI) caused by traumatic injury to the anterior cruciate ligament (ACL) of knee joint. Materials and methods: The study included 58 men involved in aerobic sports (athletics, swimming, basketball) with ACL injury. To identify the AMI phenomenon, we performed electromyographic (EMG) study of the straight head of the quadriceps femoris muscle of the injured limb using a 4-channel EMG/EP system “Viking Quest” (Nicolet, USA). Myokine levels in venous blood were determined using ELISA test systems: IL-6 (Vector-Best, Novosibirsk); concentration of transforming growth factor β , decorin, myostatin (Cloud-Clone Corp. (China); VEGF (BioKhimMak CJSC). The control group consisted of 12 healthy men, average age 34.2 ± 2.4 years. Statistical processing of the material was carried out with Statistica. vers.10.0 package (StatSoft Inc., USA). Results. In patients with ACL injury and AMT phenomenon, a significant decrease in blood concentrations of IL-6, transforming growth factor β and proteoglycan – decorin were found like as increased amounts of VEGF and MSTN, which, along with TGF- β , belong to the group of growth factors when compared with the appropriate indices in patients with ACL injury without AMT phenomenon. Discussion: A decrease in the level of IL-6, decorin and VEGF may be a consequence of forced hypokinesia in ACL injury, and the AMT formation may also result from increased myostatin blood levels, which is a negative regulator of myogenesis. Conclusion: The changed myokine concentrations in peripheral blood during traumatic damage to the capsular-ligamentous apparatus of the knee joint clearly suggest an involvement of muscle secretome into traumatic tissue damage and development of arthrogenic muscle inhibition phenomenon.

Keywords: anterior cruciate ligament, injury, electromyography, cytokines, myokines, arthrogenic muscle inhibition

Введение

Ежегодная статистика показывает высокую распространенность травм передней крестообразной связки, достигающую согласно исследованиям 3-8 случаев на тысячу человек [1]. Механизм артрогенного мышечного торможения, развивающийся после повреждения структур

коленного сустава, существенно ограничивает эффективность хирургического вмешательства и последующего реабилитационного процесса. По данным исследований [6, 8], нарушение произвольной активации четырехглавой мышцы бедра, значительно замедляет темпы восстановления пациентов после операции.

Патологические изменения афферентной импульсации от коленного сустава при разрыве передней крестообразной связки вызывают артрогенное мышечное торможение, модифицируя активность спинальных и надсегментарных структур, что приводит к снижению сократительной способности мускулатуры через модуляцию кортикальных механизмов. Недостаточное внимание к дисфункциональным изменениям квадрицепса способствует формированию стойкой мышечной гипотрофии, повышая вероятность повторных повреждений и дегенеративных изменений сустава [10]. Мышечное торможение артрогенного характера, возникающее при повреждении структур двигательного сегмента существенно влияет на активность мышечного секрета. Мониторинг концентрации миокинов в системном кровотоке после травм позволяет глубже понять механизмы регенерации соединительнотканых структур, их взаимосвязь с нейроэндокринными и иммунными процессами, особенности метаболических и морфофункциональных изменений в период деструкции и восстановления тканей.

Цель исследования — анализ направленности изменений содержания миокинов в периферической крови пациентов с артрогенным мышечным торможением вследствие травматического повреждения передней крестообразной связки коленного сустава.

Материалы и методы

В клиническом исследовании участвовали пятьдесят восемь спортсменов-мужчин (средний возраст обследуемых $35,2 \pm 2,3$ года), специализирующихся на аэробных дисциплинах с повреждением передней крестообразной связки, давностью до четырех месяцев (диагноз по МКБ-10 S83.5). Пациенты поступили в травматологическое отделение Челябинской областной клинической больницы для проведения реконструктивной операции. Диагноз подтверждался на основании проведения тестов Лахмана, определении симптома переднего выдвижного ящика при сгибании под углом 90 градусов, рентгенографическим обследованием. Электромиографическая диагностика четырехглавой мышцы бедра поврежденной конечности выполнялась на аппарате Viking Quest производства Nicolet (США) с регистрацией суммарной поверхностной электромиограммы при максимальном произвольном мышечном сокращении с определением

среднеквадратичной амплитуды в микровольтах. Результаты электромиографического исследования позволили распределить пациентов на две группы: двадцать восемь человек с артрогенным мышечным торможением и тридцать без данного феномена. Контрольные показатели были получены при обследовании двенадцати здоровых мужчин, средний возраст которых составил $34,2 \pm 2,4$ года.

Забор венозной крови у пациентов осуществлялся при госпитализации, утром строго натощак. Определение сывороточной концентрации IL-6 проводилось методом иммуноферментного анализа с применением реагентов производства АО «Вектор-Бест» (г. Новосибирск), длина волны 450 нм, диапазон измерений составлял 0–300 пг/мл. Количественная оценка содержания трансформирующего фактора роста — β , декорина и миостатина выполнялась с использованием диагностических наборов Cloud-Clone Corp. (КНР). Определение концентрации VEGF производилось посредством тест-системы производства ЗАО «БиоХимМак».

Статистическую обработку полученных результатов выполняли посредством программного обеспечения Statistica версии 10.0, StatSoft Inc. (США). Анализировались медианные значения (Me) совместно с интерквартильным размахом ($Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$). Межгрупповой анализ осуществлялся при помощи непараметрического критерия Манна–Уитни, с статистической значимостью различий при $p \leq 0,02$ учитывая поправку Бонферрони.

Результаты и обсуждение

Рисунок 1 демонстрирует уровни некоторых миокинов в крови пациентов с травмой ПКС при наличии и отсутствии феномена АМТ.

По результатам исследования пациентов с травмой ПКС и наличием феномена АМТ установлено значимое снижение концентраций IL-6, наиболее изученного представителя мышечного секрета, а также трансформирующего фактора роста β и протеогликана — декорина в крови. Во всех группах уровень IL-6 в крови не выходил за диапазон референсных значений, характерных для данной возрастно-половой когорты. Напротив, концентрации вазоформного цитокина VEGF и миостатина (MSTN), относящихся наряду с TGF- β к группе факторов роста, оказались значимо высокими в сравнении с показателями пациентов с травмой ПКС, но не имеющих фе-

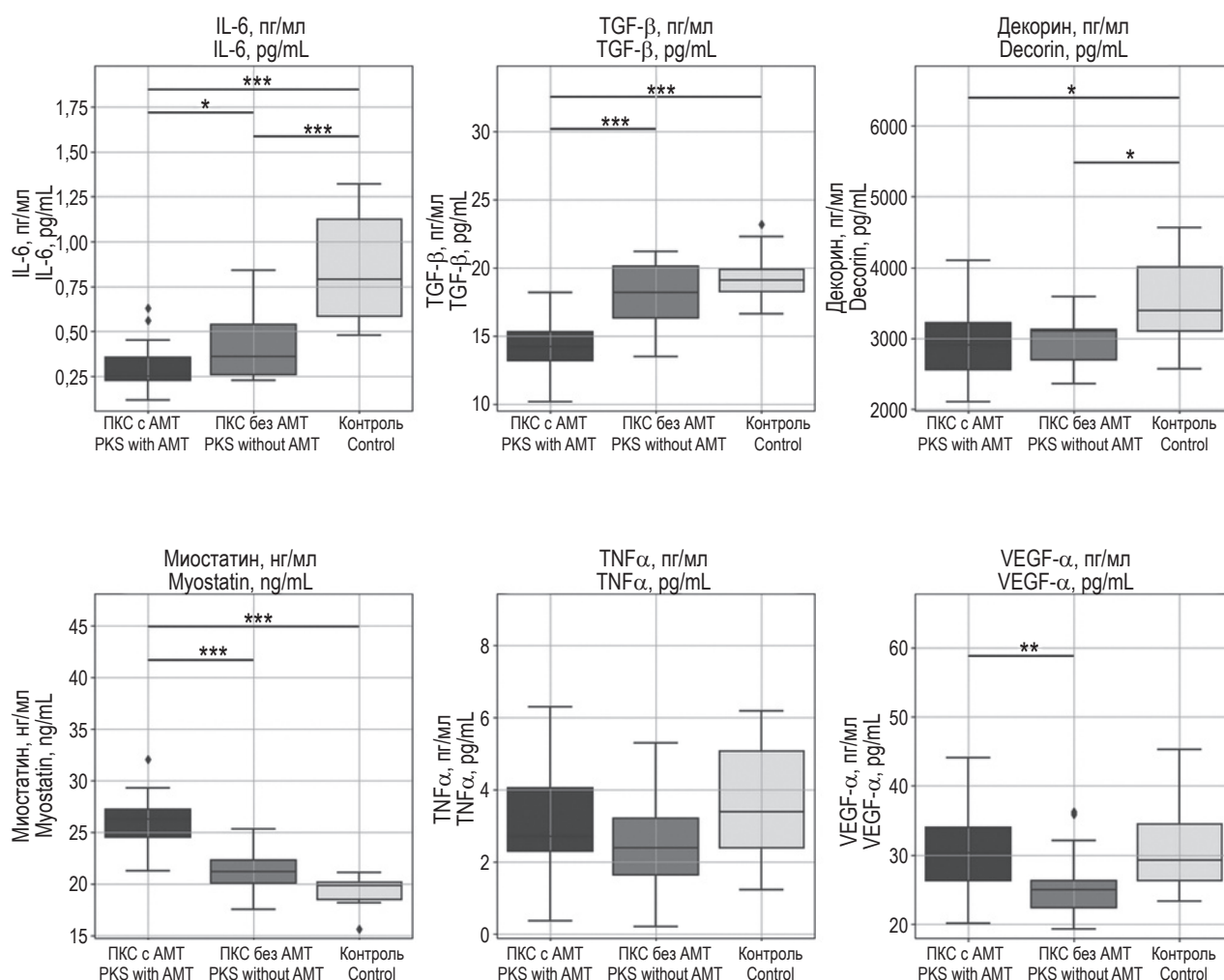


Рисунок 1. Уровни миокинов при травме ПКС с наличием феномена АМТ

Figure 1. Myokine levels in ACL injury with the presence of the AMT phenomenon

номена АМТ. Уровень $TNF\alpha$ в крови пациентов с травмой ПКС в обеих изучаемых группах пациентов с ПКС не имел значимых различий между собой и группой здоровых лиц.

Известно, что гипокинезия приводит к снижению уровня IL-6 в крови и мышечной ткани, напротив, физическая активность стимулирует его выработку в мышцах [9]. Роль IL-6 не ограничивается участием в острофазовом воспалительном ответе, а повышающая регуляция его концентрации в допустимом физиологическом диапазоне способствует обеспечению активно функционирующих мышц набором энергосубстратов [5]. Наглядным примером может служить IL-6-зависимая активация гликогенолиза в гепа-

тоцитах с параллельным увеличением экспрессии на гепатоцитах и миоцитах транспортера глюкозы 4 типа [2]. Несмотря на то, что нами не зарегистрировано изменений концентрации $TNF\alpha$ при феномене АМТ, имеются данные о синергичном модулирующем взаимодействии $TNF\alpha$ и IL-10, IL-8 на процессы миогенеза. В отношении TGF-β хорошо известно его участие в процессах восстановления, активируя цепочку сигнальных путей, а именно, Smad-белки, Erk1/2, JNK и p38, PI3K, а также через усиление экспрессии VEGF [7]. Снижение VEGF у пациентов с наличием феномена АМТ может отражать отсутствие стимулирующих васкулогенез стимулов при развитии вынужденной гипокинезии. В то же время,

экспериментально показано, что VEGF запускает пролиферацию клеток эндотелия кровеносных и лимфатических сосудов в поврежденных тканях на этапе репарации [3].

Миостатин, являющийся членом суперсемейства трансформирующих факторов роста β (TGF- β), является отрицательным регулятором миогенеза, следовательно, его повышение в крови пациентов с наличием гипокинезии артрогенного происхождения может быть закономерным следствием секреторной активности клеток-продуцентов.

Сывороточные концентрации декорина — протеогликана, в подгруппе пациентов с феноменом АМТ имели значимо низкие значения в сравнении с остальными группами. Вынужденное снижение мышечной активности пациентов,

приводящее к возникновению реципрокных отношений с миостатином, может быть обусловлено, в том числе, и снижением концентрации декорина, обладающего кроме того антифибротическими, противовоспалительными, антиоксидантными и антиангиогенными свойствами [4].

Выводы

Изменение концентрации миокинов в периферической крови при травматическом повреждении капсульно-связочного аппарата коленного сустава наглядно демонстрируют вовлеченность мышечного секрета в процессы травматического повреждения тканей и формирование феномена артрогенного мышечного торможения.

Список литературы / References

1. Анастасиева Е.А., Симагаев Р.О., Кирилова И.А. Актуальные вопросы хирургического лечения повреждений передней крестообразной связки (обзор литературы) // Гений ортопедии, 2020. № 1. С. 117-128. [Anastasiyeva E., Simagaev R., Kirilova I. Topical issues of surgical treatment of injuries of the anterior cruciate ligament (literature review). *Geniy ortopedii = Orthopedic Genius*, 2020, no. 1, pp. 117-128. (In Russ.)]
2. Касьянова Ю.В., Васюкова О.В., Окоороков П.Л., Зураева З.Т., Безлепкина О.Б. Миокиновый профиль у подростков с ожирением при аэробных физических нагрузках // Проблемы эндокринологии, 2022. Т. 68, № 4. С102-110. [Kasyanova Yu.V., Vasyukova O.V., Okorokov P.L., Zuraeva Z.T., Bezlepkin O.B. Myokine profile in obese adolescents during aerobic exercise. *Problemy endokrinologii = Problems of Endocrinology*, 2022, Vol. 68, no.4, pp.102-110. (In Russ.)]
3. Светозарский Н.Л., Артифексова А.А., Светозарский С.Н. Фактор роста эндотелия сосудов: биологические свойства и практическое значение (обзор литературы) // Journal of Siberian Medical Sciences, 2015. № 5. С. 24. [Svetozarskiy N.L., Artifeksova A.A., Svetozarskiy S.N. Growth promoting factor of endothelium of vessels: biological properties and practical value (literature review). *Journal of siberian medical sciences = Journal of Siberian Medical Sciences*, 2015, no. 5, p. 4. (In Russ.)]
4. Цориев Т.Т., Белая Ж.Е., Рожинская Л.Я. Роль миокинов в межтканевом взаимодействии и регуляции обмена веществ: обзор литературы // Остеопороз и остеопатии, 2016. Т. 19, № 1. С. 28-34. [Tsoriev T.T., White Zh.E., Rozhinskaya L.Ya. The role of myokines interstitial interaction and regulation of metabolism: a review of literature. *Osteoporoz i osteopatii = Osteoporosis and Bone Diseases*, 2016, Vol. 19, no. 1, pp. 28-34. (In Russ.)]
5. Bugera E.M., Duhamel T.A., Peeler J.D., Cornish S.M. The systemic myokine response of decorin, interleukin-6 (IL-6) and interleukin-15 (IL-15) to an acute bout of blood flow restricted exercise. *Eur. J. Appl. Physiol.*, 2018, Vol. 118, no. 12, pp. 2679-2686.
6. Lepley A.S., Lepley L.K. Mechanisms of Arthrogenic Muscle Inhibition. *J. Sport Rehabil.*, 2021, Vol. 31, no. 6, pp. 707-716.
7. Li X.Y., Wang Y.L., Yang S., Liao C.S., Li S.F., Han P.F. Correlation between vascular endothelial growth factor A gene polymorphisms and tendon and ligament injury risk: a systematic review and meta-analysis. *J. Orthop. Surg. Res.*, 2024, Vol. 9, no.1, 122. doi: 10.1186/s13018-024-04589-z.
8. Norte G., Rush J., Sherman D. Arthrogenic Muscle Inhibition: Best Evidence, Mechanisms, and Theory for Treating the Unseen in Clinical Rehabilitation. *J. Sport Rehabil.*, 2021, Vol. 31, no. 6, pp. 717-735.

9. Pedersen B.K. Physical activity and muscle-brain crosstalk. *Nat. Rev. Endocrinol.*, 2019, Vol. 15, no. 7, pp. 383-392.
10. Pietrosimone B., Lepley A.S., Kuenze C., Harkey M.S., Hart J.M., Blackburn J.T., Norte G. Arthrogenic Muscle Inhibition Following Anterior Cruciate Ligament Injury. *J. Sport Rehabil.*, 2022, Vol. 31, no. 6, pp. 694-706.

Авторы:

Ахметьянов Р.Р. — врач — травматолог-ортопед отделения травматологии и ортопедии ГБУЗ «Челябинская областная клиническая больница»; соискатель кафедры медицинской реабилитации и спортивной медицины ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Челябинск, Россия

Сабирьянов А.Р. — д.м.н., профессор, заведующий кафедрой медицинской реабилитации и спортивной медицины ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Челябинск, Россия

Authors:

Akhmetyanov R.R., Traumatologist-Orthopedist, Department of Traumatology and Orthopedics, Chelyabinsk Regional Clinical Hospital; Applicant, Department of Medical Rehabilitation and Sports Medicine, South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

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

Поступила 29.03.2025
Отправлена на доработку 16.04.2025
Принята к печати 25.05.2025

Received 29.03.2025
Revision received 16.04.2025
Accepted 25.05.2025

ПОКАЗАТЕЛИ НЕЙРОМЕДИАТОРНОГО ОБМЕНА И МАРКЕРЫ ВОСПАЛЕНИЯ ПРИ ПОСТТРАВМАТИЧЕСКОМ СТРЕССОВОМ РАССТРОЙСТВЕ У ВЕТЕРАНОВ СОВРЕМЕННЫХ ВОЙН

Пашнин С.Л., Альтман Д.Ш.

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

Резюме. Развитие посттравматического стрессового расстройства у комбатантов реализуется посредством формирования системных дезадаптивных аллостатических реакций и сопровождается нарушениями соматического и психического уровня, в виде возвратных переживаний перенесенных психотравмирующих событий, необъяснимой тревоги, гнева, вины, когнитивных расстройств, психосоматических астено-вегетативных проявлений. Цель исследования — изучение нейромедиаторного обмена и провоспалительных цитокинов при посттравматическом стрессовом расстройстве у ветеранов современных войн. Обследовано 45 ветеранов специальной военной операции на территории Украины с наличием подтвержденного диагноза ПТСР. Группу сравнения составили 25 ветеранов II Чеченской военной кампании. Контрольную — 20 здоровых военнослужащих, не принимавших участия в боевых действиях. Уровни компонентов нейромедиаторного обмена в крови определяли при помощи тест-систем фирмы Cloud-Clone Corp. (Китай). Кинуренин (нг/мл) тест — системой Immunodiagnostic AG (Германия). Концентрацию IL-1 β (пг/мл) иммуноанализаторе Luminex Magpix 100 (США). Сравнение данных проводили с помощью программы SPSS. При ПТСР у ветеранов СВО значительно снижалась концентрация серотонина, триптофана и кинуренина, на фоне повышения транспортера серотонина и IL-1 β . В группе ветеранов второй Чеченской кампании отмечено снижение серотонина и повышение транспортера серотонина в сравнении с референсной группой на фоне клинических проявлений дезадаптации в виде астено-вегетативных и соматоформных расстройств. Дефицит серотонина является ключевым фактором развития тревоги, депрессии, аффективных расстройств у комбатантов при ПТСР. Концентрация серотонина при стресс-индуцированной патологии снижается за счет дефицита триптофана и инактивации транспортером в синаптической щели. Активация метавоспалительных реакций на территории ЦНС приводит к снижению уровня кинуренина, усилению нейротоксических реакций, за счет факторов, вызывающих апоптоз астроглии, нейронов и окислительный клеточный стресс. Формирование стресс-индуцированной патологии у ветеранов

Адрес для переписки:

Пашнин Сергей Леонидович
ГБУЗ «Челябинская областная клиническая больница»
454048, Россия, г. Челябинск, ул. Воровского, 70.
Тел.: 8 (351) 749-37-75.
E-mail: spashninmd@mail.ru

Address for correspondence:

Sergey L. Pashnin
Chelyabinsk Regional Clinical Hospital
70 Vorovsky St
Chelyabinsk
454048 Russian Federation
Phone: +7 (351) 749-37-75.
E-mail: spashninmd@mail.ru

Образец цитирования:

С.Л. Пашнин, Д.Ш. Альтман «Показатели нейромедиаторного обмена и маркеры воспаления при посттравматическом стрессовом расстройстве у ветеранов современных войн» // Российский иммунологический журнал, 2025. Т. 28, № 3. С. 785–790.
doi: 10.46235/1028-7221-17193-NMA

© Пашнин С.Л., Альтман Д.Ш., 2025
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

S.L. Pashnin, D.Sh. Altman “Neuromediator metabolism and inflammation markers in posttraumatic stress disorder in the modern war veterans”, Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2025, Vol. 28, no. 3, pp. 785–790.
doi: 10.46235/1028-7221-17193-NMA

© Pashnin S.L., Altman D.Sh., 2025
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.46235/1028-7221-17193-NMA

современных войн сопровождается изменением содержания продуктов нейромедиаторного обмена, изменяющихся в условиях провоспалительного профиля крови.

Ключевые слова: посттравматическое стрессовое расстройство, серотонин, триптофан, кинуренин, провоспалительные цитокины

NEUROMEDIATOR METABOLISM AND INFLAMMATION MARKERS IN POSTTRAUMATIC STRESS DISORDER IN THE MODERN WAR VETERANS

Pashnin S.L., Altman D.Sh.

Chelyabinsk Regional Clinical Hospital, Chelyabinsk, Russian Federation

Abstract. Development of posttraumatic stress disorder in combatants proceeds via occurrence of systemic maladaptive allostatic reactions. It is accompanied by disorders at the somatic and mental levels, based on recurrent experiences of past psychotraumatic events, with unexplained anxiety, anger, guilt, cognitive disorders, psychosomatic astheno-vegetative manifestations. Our objective was to study neurotransmitter metabolism and proinflammatory cytokines in posttraumatic stress disorder in veterans of modern wars. The study included 45 veterans of a special military operation in Ukraine with a confirmed diagnosis of PTSD. The comparison group consisted of 25 veterans of 2nd Chechen military campaign. The control group included 20 healthy servicemen who did not take part in hostilities. The levels of neurotransmitter metabolic components in blood were determined using test systems from Cloud-Clone Corp. (China); kynurenine levels (ng/mL) were measured by test systems from Immunodiagnostic AG (Germany). IL-1 β concentration (pg/mL) was assayed with Luminex Magpix 100 immunoanalyzer (USA). Data comparison was performed using SPSS program. In PTSD group, the concentration of blood serotonin, tryptophan and kynurenine was significantly decreased in veterans of Special Military Operation (SMO), along with increase in serotonin transporter and IL-1 β levels. Among veterans of the 2nd Chechen campaign, a decrease in serotonin and an increase in serotonin transporter were noted if compared with reference group, along with clinical manifestations of maladaptation which manifested with asthenovegetative and somatoform disorders. Discussion: serotonin deficiency is a key factor in development of anxiety, depression, affective disorders in combatants with PTSD. Serotonin concentration in stress-induced disorders decreases due to tryptophan deficiency and its inactivation by the transporter in synaptic space. Activation of meta-inflammatory CNS reactions leads to decreased kynurenine level, induction of neurotoxic reactions due to factors causing apoptosis of astroglia, neurons and oxidative cellular stress. Development of stress-induced pathology in veterans of modern wars is accompanied by changing contents of neurotransmitter metabolic products which occur in presence of a proinflammatory blood profile.

Keywords: post-traumatic stress disorder, serotonin, tryptophan, kynurenine, proinflammatory cytokines

Введение

Посттравматическое стрессовое расстройство (ПТСР) формируется остро или в течение 6 месяцев после перенесенного острого психотравмирующего события или ситуации пролонгированного дистресса. Развитие ПТСР у комбатантов реализуется посредством формирования системных дезадаптивных аллостатических реакций и сопровождается расстройствами соматического и психического уровня, в виде возвратных пере-

живаний перенесенных психотравмирующих событий, неспособности отличать опасность от безопасности, необъяснимой тревоги, неконтролируемого гнева, чувства вины, безнадежности, спектра когнитивных расстройств, многоформных психосоматических и астено-вегетативных проявлений [3, 7]. ПТСР ассоциировано с высокой продукцией медиаторов системного воспаления, изменением нейромедиаторного обмена, серотонинергической регуляции, метаболизма триптофана и его дериватов. В частности, извест-

но, что дефицит серотонина является ключевым фактором развития тревоги, депрессии, аффективных расстройств у комбатантов [7].

Стресс-индуцированная активация гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси на фоне провоспалительного цитокинового профиля крови способствует повышению уровня циркулирующего кинуренина и, соответственно, снижению синтеза серотонина в клетках продуцентах. Морфологически в условиях стресса выявляются дегенеративные участки в тканях гиппокампа, миндалины и префронтальной коры.

Воспалительные и метавоспалительные иммуноопосредованные изменения на территории ЦНС при стрессе, вариации кишечной микробиоты, генетические и эпигенетические исследования предикторов ПТСР являются предметом научной дискуссии последних лет [2].

Целью исследования явилось изучение показателей нейромедиаторного обмена и провоспалительных цитокинов при посттравматическом стрессовом расстройстве у ветеранов современных войн.

Материалы и методы

В исследовании, выполненном на клинической базе кафедры медицинской реабилитации и спортивной медицины ФГБОУ ВО ЮУГМУ, а также отделения ранней медицинской реабили-

литации ГБУЗ Челябинская областная клиническая больница, приняли участие 45 ветеранов специальной военной операции на территории Украины (УСВО) – основная группа (1) в возрасте $45,6 \pm 3,6$ года, с наличием подтвержденного диагноза ПТСР (МКБ-10: F43.1; МКБ-11: 6B40; DSM-IV(300.xx) с изменениями указанными в DSM-V). Длительность пребывания в зоне УСВО составила от 3 мес. до 2 лет. Группу сравнения (2) составили 25 ветеранов второй Чеченской военной кампании (1999–2009 гг.), средний возраст $50,2 \pm 4,2$ года. Группу референсных значений (3) составили 20 здоровых военнослужащих в возрасте $48,7 \pm 3,6$ года, не принимавших участия в боевых действиях. Исследование одобрено решением этического комитета ООО «ДокторЛаб» (протокол № 3 от 17.10.2020 г.), подписанием информационного согласия. Критериями исключения явились тяжелые ЧМТ, иная психиатрическая стрессиндуцируемая патология, соматическая патология в стадии декомпенсации, наркопотребители.

Венозную кровь для исследования собирали в утренние часы, натощак. Уровни компонентов нейромедиаторного обмена серотонина (нг/мл), триптофана (мкг/мл), натрий-зависимого транспортера серотонина (SERT) (нг/мл) определяли при помощи тест-систем для проведения иммуноферментного анализа фирмы Cloud-Clone Corp. (Китай) при соответствующей длине вол-

ТАБЛИЦА 1. КОНЦЕНТРАЦИЯ ПРОДУКТОВ ВОСПАЛЕНИЯ И НЕЙРОМЕДИАТОРНОГО ОБМЕНА В КРОВИ ВЕТЕРАНОВ СОВРЕМЕННЫХ ВОЙН, Ме ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

TABLE 1. CONCENTRATION OF INFLAMMATION PRODUCTS AND NEUROTRANSMITTER METABOLISM IN THE BLOOD OF VETERANS OF MODERN WARS, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

Показатели Indicators	Серотонин, нг/мл Serotonin, ng/mL	Триптофан, мкг/мл Tryptophan, μg/mL	Кинуренин, нг/мл Kynurenine, ng/mL	SERT, нг/мл SERT, ng/mL	IL-1β, пг/мл IL-1β, pg/mL
Группа 1. Ветераны УСВО с ПТСР, n = 45 Group 1. USVO veterans with PTSD, n = 45	139,8 116,8-231,9	35,1 24,4-46,8	0,43 0,22-0,90	1,26 1,05-2,30	25,8 22,3-33,8
Группа 2. Ветераны 2ЧВК, n = 25 Group 2. Veterans 2PMCs, n = 25	256,2 235,6-313,4	54,8 33,1-59,4	1,2 1,1-2,10	1,79 1,52-1,87	9,8 9,5-10,2
Группа 3. Контрольная Group 3. Control n = 20	410,6 349,2-542,3	72,2 45,1-76,3	1,75 1,2-2,1	0,61 0,29-0,90	7,0 6,5-7,3
P-value	0,001 ₁₋₂ 0,01 ₂₋₃	0,01 ₁₋₃ 0,08 ₁₋₂	0,001 ₁₋₂ 0,01 ₁₋₃	0,02 ₁₋₃ 0,01 ₂₋₃	0,01 ₁₋₂ 0,001 ₁₋₃

Примечание. Достоверность различий (p) – критерий Манна–Уитни.

Note. Significance of differences (p), Mann–Whitney test.

ны. Уровень кинуренина (β -(α -аминобензол)- α -аминопропионовой кислоты, нг/мл) при помощи тест-системы Immunodiagnostic AG (Германия). Концентрацию IL-1 β (пг/мл) определяли при помощи мультиплексного анализа на иммуноанализаторе Luminex Magpix 100 (США), с набором Bio-Plex (MERZ, Германия).

Статистическую обработку проводили используя пакет прикладных программ Statistical Package for the Social Sciences (SPSS Statistics). Данные в таблице 1 представлены в виде медианы и интерквартильного размаха — Me ($Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$). Уровень значимости (p-value) с учетом поправки Бонферрони не более 0,02.

Результаты и обсуждение

Нейромедиаторный обмен на территории ЦНС модулируется посредством ауторегуляции собственных пресинаптических рецепторов, транспортеров, уменьшая или увеличивая высвобождение медиатора в синаптическую щель.

Полученные нами данные (табл. 1) свидетельствуют, что при формировании клинической картины ПТСР у ветеранов СВО имеет место значимое снижение в крови концентрации серотонина, триптофана и кинуренина — роль которого в патогенезе стресс-индуцированных и нейродегенеративных заболеваний является предметом активной дискуссии [1].

При этом уровень натрий-зависимого транспортера серотонина (SERT) в крови ветеранов УСВО с ПТСР и концентрация провоспалительного цитокина IL-1 β оказались значимо повышенными в сравнении с остальными группами, что является закономерным следствием процессов происходящих на территории ЦНС при стрессовых воздействиях. Уровень в крови серотонина в группе ветеранов 2ЧВК, имеющих нарушения адаптации в виде астено-вегетативных, психосоматических и когнитивных расстройств, также был снижен в сравнении с группой контроля (3), что проявляется в виде дистимических, ангедонических, депрессивных эпизодов. В то же время, во второй группе не отмечено снижения триптофана и кинуренина в сравнении со здоровыми военнослужащими. Однако, уровень SERT, оказался повышенным, также как и у ветеранов УСВО, что указывает на нарушение серотониновой нейротрансмиссии у лиц перенесших боевой стресс в отдаленный период. Примечательно, что в группе ветеранов 2ЧВК концентрация провоспалительного IL-1 β не превышала значений группы контроля.

Важную роль в интегрированной реакции организма при психоэмоциональном стрессе и последующем формировании стресс-индуцированной патологии занимает активация гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси, изменение нейромедиаторного обмена и формирование системного цитокин-зависимого мета-воспаления [5, 6, 8].

Одним из ключевых регуляторных аминов, обладающим функциями модулятора нервной, иммунной и эндокринной систем, является серотонин (5-НТ). Биосубстратом для синтеза 5-НТ является триптофан, концентрация которого уменьшается при пролонгированном или остром стрессе, системной воспалительной реакции, в условиях избыточной активации индоламин 2-3-диоксигеназы (IDO) [2]. Инактивация серотонина происходит за счет его обратного захвата из синаптической щели с помощью транспортера (SERT), встроенного в пресинаптическую мембрану и уровень которого при ПТСР и в группе ветеранов 2ЧВК значимо повышался. Также известно, что SERT участвует в регуляции функций иммунной системы в части контроля за передачей сигнала малых ГТФаз RhoA и Rab4, влияющих на эффекторную функцию лимфоцитов и других иммунных клеток [4].

В условиях метавоспаления активированные Т-лимфоциты могут синтезировать серотонин, который со своей стороны, играет важную роль в регуляции активности самих Т-клеток [1]. Известно, что концентрация 5-НТ максимальна в области гипоталамуса и среднего мозга, и при его снижении наблюдается агрессивность, диссоматические расстройства, составляющие ядро ПТСР [1].

Цитокиновый провоспалительный профиль при стрессе формирует метавоспалительные изменения в ЦНС и способствует смещению баланса метаболизма кинуренина в сторону преобладания нейротоксического пути над нейропротекторным. Так, в условиях стресса и системного воспаления, опосредованного провоспалительными цитокинами, в частности IL1- β , нами показано снижение концентрации кинуренина, одного из продуктов деградации триптофана. Кинурениновый путь — это путь метаболизма триптофана, активирующийся вовремя стресса, вследствие повышения экспрессии фермента IDO, способствующей распаду триптофана по кинурениновому пути в ЦНС, лимфоидных клетках. Кинурениновый путь, с одной стороны, играет важную роль в метаболизме глюкозы, поскольку АТФ и 3-гидроксиантралиновая кислота, образующиеся при этом, активируют гликолиз в

условиях стресса. С другой стороны, при стрессе снижается доступность серотонина для серотонинергической нейротрансмиссии, что является ключевым фактором для развития тревожно-депрессивных расстройств при ПТСР [10]. Активация метавоспалительных реакций на территории ЦНС приводит к смещению баланса в сторону продукции из кинуренина нейротоксических факторов – 3-ОНК (3-гидроксикинуренина) и хинолиновой кислоты (QUIN), вызывающих апоптоз астроцитов, нейронов, ослабляя нейроглиальное взаимодействие, и, напротив, снижая продукцию глиального и мозгового нейротрофических пептидов и кинуреновой кислоты, обладающих нейропротекторными свойствами. Также показано, что токсические нейрометаболиты 3-ОНК и QUIN способствуют генерации сво-

бодных радикалов и приводят к окислительному клеточному стрессу нейронов [9].

Выводы

1. Формирование стресс-индуцированной патологии у ветеранов современных войн сопровождается изменением содержания серотонина – одного из основных регуляторов нейромедиаторного обмена, а также его субстратов, транспортеров, изменяющихся в условиях провоспалительного цитокинового профиля крови.

2. Активация кинуренин-зависимого пути в условиях стресса приводит к образованию нейротоксических дериватов, накапливающихся в нейронах и способствующих развитию стресс-индуцированных нейродегенеративных изменений при ПТСР.

Список литературы / References

1. Бонь Е.И. Характеристика медиаторов и модуляторов, их биологическая роль в функционировании нервной системы // Вестник Новгородского государственного университета, 2021. № 1 (122). С. 6-14. [Bon' E.I. Characteristics of mediators and modulators, their biological role in the functioning of the nervous system. *Vestnik Novgorodskogo gosudarstvennogo universiteta* = *Bulletin of Novgorod State University*, 2021, no. 1 (122), pp. 6-14. (In Russ.)]
2. Комарова О.Н., Хавкин А.И. Взаимосвязь стресса, иммунитета и кишечной микробиоты // Педиатрическая фармакология, 2020. Т. 17, № 1. С. 18-24. [Komarova O.N., Khavkin A.I. Correlation Between Stress, Immunity and Intestinal Microbiota. *Pediatricheskaya farmakologiya* = *Pediatric Pharmacology*, 2020, Vol. 17, no. 1, pp. 18-24. (In Russ.)]
3. Пашнин С.Л., Давыдова Е.В., Альтман Д.Ш. Нейроцитокиновый профиль крови ветеранов современных боевых конфликтов с посттравматическим стрессовым расстройством // Российский иммунологический журнал, 2024. Т. 27, № 2. С. 343-350. [Pashnin S.L., Davydova E.V., Altman D.Sh. Neurocytokine blood profile of veterans of modern combat conflicts with post-traumatic stress disorder. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal* = *Russian Journal of Immunology*, 2024, Vol. 27, no. 2, pp. 343-350. (In Russ.)] doi: 10.46235/1028-7221-16669-NBP.
4. Терентьев А.А., Лычкова А.Э., Казимирский А.Н., Пузиков А.М. Моноаминергическая регуляция иммунитета. Часть I // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология, 2016. № 3. С. 32-39. [Terentev A.A., Lychkova A.E., Kazimirsky A.N., Puzikov A.M. Serotonergic regulation of immunity. Part I. *Ekspperimentalnaya i klinicheskaya gastroenterologiya* = *Experimental and Clinical Gastroenterology*, 2016, no. 3, pp. 32-39. (In Russ.)]
5. Умрюхин А.Е. Нейромедиаторные гиппокампальные механизмы стрессорного поведения и реакций избегания // Вестник новых медицинских технологий, 2013. № 1. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://cyberleninka.ru/article/n/neyromediatornye-gippokampalnye-mehanizmy-stressornogo-povedeniya-i-reaktsiy-izbeganiya>. [Umryukhin A.E. Neurotransmitter hippocampal mechanisms of stress behavior and avoidance reactions. *Vestnik novykh meditsinskikh tekhnologiy* = *Bulletin of New Medical Technologies. Electronic Publication*. 2013, no. 1. [Electronic resource]. Available at: <https://cyberleninka.ru/article/n/neyromediatornye-gippokampalnye-mehanizmy-stressornogo-povedeniya-i-reaktsiy-izbeganiya>. (In Russ.)]
6. Gusev E.Yu., Zotova N.V. Cellular stress and general pathological processes. *Curr. Pharmac. Design*, 2019, Vol. 25, pp. 251-297.
7. Iqbal J., Huang G.D., Xue Y.X., Yang M., Jia X.J. The neural circuits and molecular mechanisms underlying fear dysregulation in posttraumatic stress disorder. *Front. Neurosci.*, 2023, Vol. 17, 1281401. doi: 10.3389/fnins.2023.1281401.

8. 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, Vol. 1186, pp. 190-222.
9. O'Farrell K., Harkin A. Stress-related regulation of the kynurenine pathway: Relevance to neuropsychiatric and degenerative disorders. *Neuropharmacology*, 2017, Vol. 112, Pt B, pp. 307-323.
10. Vogt N. Sensing neurotransmitters. *Nat. Methods*, 2019, Vol. 16, no. 1, 17. doi: 10.1038/s41592-018-0268-8.

Авторы:

Пашнин С.Л. — врач-нейрохирург, заслуженный врач РФ, заведующий отделением нейрохирургии 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

Authors:

Pashnin S.L., Neurosurgeon, Honored Doctor of the Russian Federation, Head, Department of Neurosurgery, Chelyabinsk Regional Clinical Hospital, Chelyabinsk, Russian Federation

Altman D.Sh., PhD, MD (Medicine), Professor, Honored Doctor of the Russian Federation, Chief Physician, Chelyabinsk Regional Clinical Hospital, Chelyabinsk, Russian Federation

Поступила 29.03.2025

Отправлена на доработку 17.04.2025

Принята к печати 25.05.2025

Received 29.03.2025

Revision received 17.04.2025

Accepted 25.05.2025

ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫЕ ЦИТОКИНЫ И РИСК РАЗВИТИЯ ОСТЕОПОРОТИЧЕСКИХ ПЕРЕЛОМОВ У ПАЦИЕНТОК С РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ В ПОСТМЕНОПАУЗЕ

Александрова Н.В.¹, Сивордова Л.Е.¹, Курчина Е.Р.², Ершов Я.Д.²,
Красильников А.Н.², Полякова Ю.В.¹

¹ ФГБНУ «Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной ревматологии
имени А.Б. Зборовского», г. Волгоград, Россия

² ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения
РФ, г. Волгоград, Россия

Резюме. Несмотря на повышенный риск переломов у пациентов со злокачественными новообразованиями (ЗНО), особенно с раком молочной железы (РМЖ), оценка состояния костной ткани и профилактическое лечение остеопороза (ОП) по-прежнему носят частичный характер. Цель исследования — изучить влияние маркеров системного воспаления на выраженность остеопоротических изменений и оценить их связь с предполагаемым 10-летним риском низкоэнергетических переломов, установленным с помощью FRAX, у пациенток с РМЖ в постменопаузе. В исследование были включены 85 женщин в постменопаузе с ЗНО различной локализации, из них 40 пациенток с РМЖ. Всем пациенткам с РМЖ была выполнена двухэнергетическая рентгеновская абсорбциометрия, проведена оценка 10-летней вероятности перелома по FRAX и выполнено измерение IL-1 β , IL-6, TNF α методом количественного иммуноферментного анализа. Среднее время, прошедшее после установления диагноза ЗНО до направления на обследование по поводу ОП, составило 3 (2,0–4,0) года. У пациенток с ЗНО в 51,2% случаев был диагностирован ОП, в 37,2% — остеопения. В группе больных РМЖ остеопения была отмечена у 16 пациенток, ОП — у 19 человек. В 42,5% случаев пациенткам с РМЖ была проведена адъювантная химиотерапия, у 87,5% — адъювантная гормональная терапия (использовались различные режимы гормонотерапии в постменопаузе). При сравнении показателей цитокинов в группах пациенток с РМЖ при наличии (47,5%) или отсутствии ОП было установлено: IL-1 β был выше у пациенток с ОП как по сравнению с нормой, так и по сравнению с остеопенией ($p = 0,027$ и $p = 0,029$ соответственно); IL-6 был выше только у пациенток с ОП по сравнению с нормой ($p = 0,011$); TNF α при ОП и остеопении превышал показатели лиц без остеопоротических нарушений ($p = 0,001$ и $p = 0,039$ соответственно). Уровень TNF α коррелировал с показателем риска больших остеопоротических переломов (FRAX:MOF) ($r_s = 0,33$, $p = 0,036$) и IL-6 ($r_s = 0,55$). В группе больных РМЖ с «высоким» (> медианы) уровнем TNF α был отмечен более высокий 10-летней

Адрес для переписки:

Александрова Нинель Владимировна
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
клинической и экспериментальной ревматологии
имени А.Б. Зборовского»
400138, Россия, г. Волгоград, ул. им. Землячки,
76, корп. 2.
Тел.: 8 (8442) 78-90-98.
E-mail: nynel68@mail.ru

Address for correspondence:

Ninel V. Aleksandrova
A. Zborovsky Research Institute of Clinical
and Experimental Rheumatology
76 Zemlyachki St, Bldg 2
Volgograd
400138 Russian Federation
Phone: +7 (8442) 78-90-98.
E-mail: nynel68@mail.ru

Образец цитирования:

Н.В. Александрова, Л.Е. Сивордова, Е.Р. Курчина,
Я.Д. Ершов, А.Н. Красильников, Ю.В. Полякова
«Провоспалительные цитокины и риск развития
остеопоротических переломов у пациенток с раком
молочной железы в постменопаузе» // Российский
иммунологический журнал, 2025. Т. 28, № 3. С. 791–796.
doi: 10.46235/1028-7221-17177-PCA

© Александрова Н.В. и соавт., 2025
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

N.V. Aleksandrova, L.E. Sivordova, E.R. Kurchina,
Ya.D. Ershov, A.N. Krasilnikov, Yu.V. Polyakova
“Proinflammatory cytokines and the risk of osteoporotic
fractures in postmenopausal breast cancer patients”, Russian
Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii
Zhurnal, 2025, Vol. 28, no. 3, pp. 791–796.
doi: 10.46235/1028-7221-17177-PCA

© Aleksandrova N.V. et al., 2025
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.46235/1028-7221-17177-PCA

риск переломов позвонков ($p = 0,003$). Таким образом, провоспалительные цитокины принимают активное участие в процессах резорбции костной ткани, а пациентки с РМЖ в постменопаузе имеют повышенный предполагаемый 10-летним риск низкоэнергетических переломов позвоночника при наличии высоких показателей $\text{TNF}\alpha$.

Ключевые слова: провоспалительные цитокины, рак молочной железы, постменопауза, остеопороз, низкоэнергетические переломы, FRAX

PROINFLAMMATORY CYTOKINES AND THE RISK OF OSTEOPOROTIC FRACTURES IN POSTMENOPAUSAL BREAST CANCER PATIENTS

Aleksandrova N.V.^a, Sivordova L.E.^a, Kurchina E.R.^b, Ershov Ya.D.^b, Krasilnikov A.N.^b, Polyakova Yu.V.^a

^a A. Zborovsky Research Institute of Clinical and Experimental Rheumatology, Volgograd, Russian Federation

^b Volgograd State Medical University, Volgograd, Russian Federation

Abstract. Despite the increased risk of bone fractures in patients with malignant neoplasms (MN), especially breast cancer (BC), bone health assessment and preventive treatment of osteoporosis (OP) still remain understudied. The aim of our work was to investigate the significance of systemic inflammatory markers in relation to severity of osteoporotic changes, and to evaluate their association with the estimated 10-year risk of low-energy fractures determined by FRAX in postmenopausal patients with breast cancer. Patients and methods: The study included 85 postmenopausal women with different malignancies, including 40 BC patients. All patients with BC underwent dual-energy X-ray absorptiometry, the 10-year probability of fracture was assessed by FRAX. $\text{IL-1}\beta$, IL-6 , and $\text{TNF}\alpha$ were measured by quantitative enzyme-linked immunosorbent assay. The mean time since diagnosis of MN until referral for osteoporosis (OP) was 3 (2.0–4.0) years. In patients with MN, OP was diagnosed in 51.2% of cases, and osteopenia – in 37.2%. In the group of BC patients, osteopenia was documented in 16 patients, OP, in 19 cases. Adjuvant chemotherapy was performed in 42.5% of cases among breast cancer patients, and adjuvant hormonal therapy was performed in 87.5% of cases (different postmenopausal hormone therapies were used). When comparing the cytokine levels in BC subgroups with presence (47.5%) or absence of OP, we have found that $\text{IL-1}\beta$ was higher in patients with OP as compared to both normal persons and osteopenic patients ($p = 0.027$ and $p = 0.029$, respectively); IL-6 was higher only in patients with OP compared to normal subjects ($p = 0.011$); $\text{TNF}\alpha$ in OP and osteopenia exceeded those values in OP-free cases ($p = 0.001$ and $p = 0.039$, respectively). $\text{TNF}\alpha$ levels correlated with the risk score for large osteoporotic fractures (FRAX:MOF) ($r_s = 0.33$, $p = 0.036$) and IL-6 ($r_s = 0.55$). A higher 10-year risk of vertebral fractures ($p = 0.003$) was observed in the group of BC patients with ‘high’ (> median) $\text{TNF}\alpha$ levels. In summary, proinflammatory cytokines seem to be involved in bone resorption processes. Postmenopausal BC patients have an increased estimated 10-year risk of low-energy spine fractures associated with high $\text{TNF}\alpha$ levels.

Keywords: pro-inflammatory cytokines, breast cancer, postmenopause, osteoporosis, low-energy fractures, FRAX

Введение

По данным многочисленных источников, рак молочной железы (РМЖ) остается ведущей патологией злокачественных новообразований (ЗНО) у женщин в большинстве стран мира, в том числе и в России [1], практически с ежегодным приростом первичных случаев. Методы лечения гормонально-чувствительных видов ЗНО, таких как рак РМЖ и рак предстательной железы, вызывают потерю костной массы и увеличивают риск остеопороза (ОП). Отмечено, что количество переломов увеличивается после постановки диагноза ЗНО и в последующем частота переломов остается повышенной как минимум в течение 10

лет [12]. Кроме того, кость является специфическим целевым органом для метастазов РМЖ. Несмотря на повышенный риск переломов у пациентов с ЗНО, оценка состояния костной ткани и профилактическое лечение ОП по-прежнему носят частичный характер [10].

Золотым стандартом диагностики ОП в настоящее время остается измерение минеральной плотности костной ткани (МПКТ) с помощью двухэнергетической рентгеновской абсорбциометрии (DXA) [11]. Однако показатель МПКТ сам по себе может быть недостаточно чувствительным при индивидуальной оценке риска переломов, поскольку в достаточно большом проценте случаев при наличии переломов в анамнезе зна-

чения МПКТ не достигают показателей, характерных для ОП [9]. Дополнительным инструментом оценки риска развития остеопоротических переломов является алгоритм FRAX (Fracture Risk Assessment Tool), позволяющий рассчитать вероятность возникновения остеопоротических переломов в ближайшие 10 лет.

Несмотря на множество потенциальных причин повышенного риска переломов, с которыми сталкиваются пациенты с РМЖ (лучевая терапия, повышающая риск локальных переломов; использование повторных кратких курсов глюкокортикоидов в высоких дозировках; рост числа факторов, повышающих риск падений и др.), к наиболее распространенным группам риска потери МПКТ можно отнести необходимость обеспечения овариальной супрессии для назначения препаратов, разрешенных к применению только у пациенток в менопаузе, и использование химиотерапии [8], также подавляющую функцию яичников. Эстроген регулирует экспрессию провоспалительных цитокинов (таких как интерлейкин-1 β , интерлейкин-6, фактор некроза опухоли-альфа и др.), продуцируемых остеобластами и стромальными клетками костного мозга. Интегрированные в сигнальную ось RANKL/OPG данные цитокины способствуют формированию остеокластов и дефицит эстрогена может привести к повышению уровней цитокинов, участвующих в процессах резорбции кости [7].

Принимая активное участие в различных физиологических и патологических процессах [2, 3] провоспалительные цитокины и, в первую очередь, интерлейкин(ИЛ)-1 β и фактор некроза опухоли альфа (TNF α), накопили веские биологические доказательства, подтверждающие значимость данных цитокинов в развитии хрупкости кости и переломах. Так, например, ИЛ-1 β рассматривается в качестве ключевого медиатора разрушения кости при ревматоидном артрите и ОП, а терапия ингибиторами TNF α у пациентов с ревматоидным артритом и анкилозирующим спондилитом ведет к замедлению потери костной массы [6]. Однако у пациенток с РМЖ, в частности получавших лечение ингибиторами ароматазы, оценка возможности использования провоспалительных цитокинов в качестве предикторов риска переломов не получила убедительных доказательств [7].

Цель исследования — изучить влияние маркеров системного воспаления на выраженность остеопоротических изменений и оценить их связь с предполагаемым 10-летним риском низкоэнергетических переломов, установленным с помощью FRAX, у пациенток с РМЖ в постменопаузе.

Материалы и методы

В исследование были включены 85 женщин в постменопаузе с ЗНО различной локализации,

из них 40 пациенток с РМЖ, обращавшиеся в «Центр диагностики и лечения остеопороза» при НИИ КиЭР им. А.Б. Зборовского в период 2018–2021 гг. Были исключены пациенты с инфекционными заболеваниями, заболеваниями печени, с резко сниженной скоростью клубочковой фильтрации, а также, если они получали антирезорбтивные препараты в период не менее 2 лет до исследования. Письменное информированное согласие на участие в исследовании было получено от каждого участника.

Сбор анамнестических данных, оценка клинико-лабораторных проявлений и консультация ревматолога по результатам двухэнергетической рентгеновской абсорбциометрии (DXA) на аппарате LUNAR DPX (GE, США) по стандартной программе (зона позвоночника L1-L4 и проксимальный отдел бедренной кости) были проведены всем пациентам, включенным в исследование. Диагностику ОП осуществляли с использованием Т-критерия в соответствии с современными рекомендациями. При оценке 10-летней вероятности перелома использовали российскую версию онлайн калькулятора индекса FRAX. Всем пациентам было выполнено измерение провоспалительных цитокинов (IL-1 β , IL-6, TNF α) методом количественного иммуноферментного анализа с использованием диагностических наборов производства АО «Вектор-бест» (Россия).

Статистический анализ проводился с использованием программы Statistica 10.0 (StatSoft Inc., США). Непрерывные переменные были выражены как медианные значения данных с ненормальным распределением — Me (Q_{0,25}–Q_{0,75}). При определении межгрупповых различий использовали U-критерий Манна–Уитни (MWU test) и дисперсионный анализ Краскела–Уоллиса (Kruskal–Wallis ANOVA H test), по обстоятельству. Для количественной оценки корреляционных связей использовали коэффициент корреляции Спирмена (r_s). Статистическая значимость была установлена на уровне $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

По первичной локализации ЗНО пациенты распределились следующим образом: 46,5% — молочная железа, 18,6% — матка, по 8,2% — яичник, кишечник и щитовидная железа, по 2,3% — эндометрий, желудок, почки и мочевого пузыря, 1,1% — дуоденальный сосочек. Среднее время, прошедшее после установления диагноза ЗНО до направления на обследование по поводу ОП (проведение DXA, консультация ревматолога), составило 3 (2,0–4,0) года и сильно различалось в группах лиц с РМЖ (1 (1,0–2,0) год) и другими ЗНО (4 (3,0–5,0) года; MWU test, $p < 0,001$), что свидетельствует о настороженности врачей в плане остеопоротических осложнений РМЖ и осведомленности пациентов с данной патологией о

рисках переломов и необходимости тщательного наблюдения в отношении состояния костной ткани. В целом, пациентам с РМЖ рекомендуется проведение DXA и оценка риска переломов еще до начала противоопухолевой лекарственной терапии, но конкретные указания на этот счет и соблюдение рекомендаций различаются в разных онкологических центрах.

По результатам клинико-лабораторного обследования и данных денситометрии у пациентов с ЗНО в 51,2% случаев был диагностирован ОП, в 37,2% — остеопения. По данным анамнеза переломы костей (различной локализации) были отмечены у 44 человек (51%). Данные, полученные при помощи инструмента оценки 10-летнего риска переломов по FRAX в общей группе больных ЗНО, продемонстрировали высокий риск больших остеопоротических переломов (Major Osteoporotic Fracture, MOF) у 24,4% и высокий риск перелома бедра (Hip Fracture, HF) у 21% обследованных лиц. Не было отмечено различий в сравниваемых группах с различными ЗНО по показателям FRAX риска переломов позвоночника и бедра (H test, $p = 0,2$ и $p = 0,31$ соответственно).

Средний возраст пациенток с РМЖ составил $60,7 \pm 10,6$ года и не отличался от группы пациентов с другими ЗНО (MWU test, $p = 0,52$), также не было обнаружено межгрупповых различий по индексу массы тела (ИМТ) (MWU test, $p = 0,69$). Высокий ИМТ является известным фактором риска как для РМЖ, так и для более высоких показателей МПКТ, которая, в свою очередь, также ассоциируется с повышенным риском РМЖ [12].

Известно, что многие методы лечения рака оказывают пагубное воздействие на костную ткань. В частности, адъювантная гормонотерапия РМЖ способствует снижению МПКТ и раз-

витию ОП и малотравматических переломов [5]. В 42,5% случаев пациенткам с РМЖ, включенным в исследование, была проведена адъювантная химиотерапия, у 87,5% — адъювантная гормональная терапия (использовались различные режимы гормонотерапии в постменопаузе). Известно, что аддитивные эффекты противоопухолевой терапии, подавляющую функцию яичников, также подвергают женщин с РМЖ повышенному риску потери МПКТ и переломов.

Средние значения воспалительных цитокинов у пациенток с РМЖ составили 1,18 (0,91–1,41) пг/мл для IL-1 β , 1,27 (0,81–1,86) пг/мл для IL-6 и 5,93 (3,1–8,7) пг/мл для TNF α . Сначала мы изучили уровни цитокинов в группах пациенток с РМЖ при наличии или отсутствии ОП (табл. 1). Уровни IL-1 β были значительно выше у пациенток с ОП как по сравнению с нормой, так и по сравнению с группой пациенток с остеопенией (H test, $p = 0,027$ и $p = 0,029$ соответственно). Показатели IL-6 продемонстрировали достоверные различия только при сравнении I и III групп (H test, $p = 0,011$). Уровни TNF α при ОП и остеопении были сопоставимы ($p > 0,05$) и достоверно превышали показатели лиц без остеопоротических нарушений (H test, $p = 0,001$ и $p = 0,039$ соответственно).

При обработке данных, полученных при помощи инструмента оценки риска переломов — FRAX у пациенток с РМЖ (на основании значений индивидуальной 10-летней вероятности основных патологических переломов у пациента соответствующего возраста), было установлено, что высокий риск больших остеопоротических переломов (FRAX:MOF) отмечался у 37,5%, а высокий риск перелома бедра (FRAX:HF) — у 22,5% лиц с данной патологией. Уровень TNF α

ТАБЛИЦА 1. ПОКАЗАТЕЛИ МАРКЕРОВ ВОСПАЛЕНИЯ У ПАЦИЕНТОК С РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ОСТЕОПОРТИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ

TABLE 1. INFLAMMATORY MARKER LEVELS IN BREAST CANCER PATIENTS ACCORDING TO OSTEOPOROTIC DISORDERS

Переменные Variables	Больные РМЖ с различными остеопоротическими нарушениями Breast cancer patients with various osteoporotic disorders		
	Группа I (норма) Group I (normal) n = 5	Группа II (остеопения) Group II (osteopenia) n = 16	Группа III (остеопороз) Group III (osteoporosis) n = 19
IL-1 β , пг/мл IL-1 β , pg/mL	0,99 (0,88-1,03)	1,06 (0,83-1,24)	1,38 (1,15-1,54)* ***
IL-6, пг/мл IL-6, pg/mL	0,65 (0,47-0,82)	1,21 (0,77-1,47)	1,79 (1,07-2,23)*
TNF α , пг/мл TNF α , pg/mL	1,93 (1,53-1,97)	3,77 (3,09-7,06)**	6,57 (4,18-9,25)*

Примечание. РМЖ — рак молочной железы, IL-1 β — интерлейкин-1 β , IL-6 — интерлейкин-6, TNF α — фактор некроза опухоли альфа, n — количество пациенток с РМЖ. * — статистически значимые различия между группами I-III, ** — статистически значимые различия между группами I-II, *** — статистически значимые различия между группами II-III.

Note. BC, breast cancer; IL-1 β , interleukin-1 β ; IL-6, interleukin-6; TNF α , tumor necrosis factor alpha; n, number of patients with BC; *, statistically significant differences between groups I-III; **, statistically significant differences between groups I-II. ***, statistically significant differences between groups II-III.

ТАБЛИЦА 2. ПОКАЗАТЕЛИ FRAX У ПАЦИЕНТОК С РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ УРОВНЯ ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ

TABLE 2. FRAX INDICES IN PATIENTS WITH BREAST CANCER DEPENDING ON THE LEVEL OF PROINFLAMMATORY CYTOKINES

Переменные Variables	IL-1 β , пг/мл IL-1 β , pg/mL		IL-6, пг/мл IL-6, pg/mL		TNF α , пг/мл TNF α , pg/mL	
	Низкий Low (n = 20)	Высокий High (n = 20)	Низкий Low (n = 22)	Высокий High (n = 18)	Низкий Low (n = 22)	Высокий High (n = 18)
FRAX:MOF	11 (8,2-17)	11 (8,6-14)	11 (8,1-17)	11 (8,7-14)	9,4 (7,6-12)	14 (11-19)*
FRAX:HF	1,25 (0,6-2,4)	1,05 (0,6-1,85)	1,05 (0,4-2,1)	1,1 (0,6-1,9)	0,95 (0,3-1,9)	1,25 (0,6-4,6)

Примечание. FRAX:MOF – Major Osteoporotic Fracture, 10-летний риск больших остеопоротических переломов по FRAX; FRAX:HF – Hip Fracture, 10-летний риск переломов бедра по FRAX; IL-1 β – интерлейкин-1 β , IL-6 – интерлейкин-6, TNF α – фактор некроза опухоли альфа, n – количество пациенток с РМЖ. * – статистически значимые различия при $p < 0,05$.

Note. FRAX:MOF, Major Osteoporotic Fracture, 10-year risk of major osteoporotic fractures according to FRAX; FRAX:HF, Hip Fracture, 10-year risk of hip fractures according to FRAX; IL-1 β , interleukin-1 β ; IL-6, interleukin-6; TNF α , tumor necrosis factor alpha; n, number of patients with breast cancer. *, statistically significant differences at $p < 0.05$.

коррелировал с FRAX:MOF ($r_s = 0,33$, $p = 0,036$) и IL-6 ($r_s = 0,55$). Других ассоциаций между уровнем цитокинов и показателями FRAX не определялось. Ввиду недоступности определяемого порога чувствительности непрерывные значения изучаемых цитокинов были дихотомизированы в соответствии с медианой и распределены по двум группам: I – «низкие значения» ($\leq$ медианы), II – «высокие значения» ($>$ медианы). Аналогичные подходы уже были использованы ранее [4]. Не было обнаружено статистически значимых различий внутри сформированных подгрупп по каждому цитокину в отношении возраста, ИМТ, длительности менопаузы, количества предшествующих переломов. Только в группе больных РМЖ с «высоким» уровнем TNF α был отмечен более высокий 10-летний риск переломов позвонков (MWU test, $p = 0,003$) (табл. 2). При расчете FRAX у пациенток с РМЖ следует учитывать различные клинические факторы риска, но в настоящее время не разработана специальная версия для оценки риска переломов у данной категории лиц [4]. Включение дополнительных опций («вторичный остеопороз», «ревматоидный артрит», включение/исключение показателей

МПКТ) не оказывало существенного влияния на полученные результаты. Возможность использования TNF α или других цитокинов в качестве предикторов риска переломов у женщин с РМЖ требует изучения в рамках проспективных исследований. Недостаток информации о провоспалительных цитокинах, ремоделировании кости и долгосрочной оценки риска низкоэнергетических переломов в реальной клинической практике обследования и лечения женщин с РМЖ предполагает необходимость дальнейших исследований в данном направлении.

Выводы

Провоспалительные цитокины принимают активное участие в процессах резорбции костной ткани. Пациентки с РМЖ в постменопаузе имеют повышенный предполагаемый 10-летним риск низкоэнергетических переломов позвоночника при наличии высоких показателей TNF α . Пациентки с РМЖ должны наблюдаться у ревматолога по поводу ОП и низкоэнергетических переломов, причем уже на ранних этапах следует применять активные профилактические меры.

Список литературы / References

1. Мерабишвили В.М. Состояние онкологической помощи в России: рак молочной железы среди женского населения. Заболеваемость, смертность, достоверность учета, детальная локализационная и гистологическая структура (популяционное исследование на уровне федерального округа) // Вопросы онкологии, 2022. Т. 68, № 3. С. 286-293. [Merabishvili V.M. The state of oncological care in Russia: breast cancer among the female population. Incidence, mortality, reliability of registration, detailed localization and histological structure (population study at the federal district level). *Voprosy onkologii = Issues of Oncology*, 2022, Vol. 68, no. 3, pp. 286-293. (In Russ.)]
2. Aleksandrov A.V., Aleksandrova N.V. Peculiarities of interaction of chronic inflammation and depression in rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.*, 2021, Vol. 80, Suppl. 1, 1110. doi: 10.1136/annrheumdis-2021-eular.3087.
3. Aleksandrova N.V., Aleksandrov V.A., Zagorodnaya E.A., Nikitina N.V., Aleksandrov A.V. Cytokines as potential biomarkers of atherosclerotic vascular lesions in rheumatoid arthritis. *Aging Clin. Exp. Res.*, 2023, Vol. 35, s1, pp. 395-396.
4. Di Meglio A., Havas J., Pagliuca M., Franzoi M.A., Soldato D., Chiodi C.K., Gillanders E., Dubuisson F., Camara-Clayette V., Pistilli B., Ribeiro J., Joly F., Cottu P.H., Tredan O., Bertaut A., Ganz P.A., Bower J., Partridge A.H.,

Martin A.L., Everhard S., Boyault S., Brutin S., André F., Michiels S., Pradon C., Vaz-Luis I. A bio-behavioral model of systemic inflammation at breast cancer diagnosis and fatigue of clinical importance 2 years later. *Ann. Oncol.*, 2024, Vol. 35, no. 11, pp. 1048-1060.

5. Goldvaser H., Barnes T.A., Šeruga B., Cescon D.W., Ocaña A., Ribnikar D., Amir E. Toxicity of Extended Adjuvant Therapy With Aromatase Inhibitors in Early Breast Cancer: A Systematic Review and Meta-analysis. *J. Nat. Cancer Inst.*, 2018, Vol. 110, no. 1, pp. 31-39.

6. Gulyás K., Horváth Á., Végh E., Pusztai A., Szentpétery Á., Pethő Z., Vánca A., Bodnár N., Csomor P., Hamar A., Bodoki L., Bhattoa H.P., Juhász B., Nagy Z., Hodosi K., Karosi T., FitzGerald O., Szűcs G., Szekanecz Z., Szamosi S., Szántó S. Effects of 1-year anti-TNF- α therapies on bone mineral density and bone biomarkers in rheumatoid arthritis and ankylosing spondylitis. *Clin. Rheumatol.*, 2020, Vol. 39, no. 1, pp. 167-175.

7. Liang E., Beshara M., Sheng H., Huang X.W., Roh J.M., Laurent C.A., Lee C., Delmerico J., Tang L., Lo J.C., Hong C.C., Ambrosone C.B., Kushi L.H., Kwan M.L., Yao S. A prospective study of vitamin D, proinflammatory cytokines, and risk of fragility fractures in women on aromatase inhibitors for breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.*, 2024, Vol. 208, no. 2, pp. 349-358.

8. Nisha Y., Dubashi B., Bobby Z., Sahoo J.P., Kayal S., Ananthakrishnan R., Reddy V.B., Charles L., Ganesan P. Negative impact on bone homeostasis in postmenopausal women with non-metastatic breast cancer during cytotoxic chemotherapy. *J. Bone Miner. Metab.*, 2023, Vol. 41, no. 5, pp. 682-692.

9. Pedersini R., Cosentini D., Rinaudo L., Zamparini M., Olivieri F.M., di Mauro P., Maffezzoni F., Monteverdi S., Vena W., Laini L., Amoroso V., Simoncini E.L., Farina D., Mazziotti G., Berruti A. Assessment of DXA derived bone quality indexes and bone geometry parameters in early breast cancer patients: A single center cross-sectional study. *Bone Rep.*, 2023, Vol. 18, 101654. doi: 10.1016/j.bonr.2023.101654

10. Rouach V., Greenman Y., Chodick G., Goldstein I. DXA assessment and fracture prevention in hormone positive breast cancer patients after treatment initiation with aromatase inhibitors: A registry-based cohort study. *J. Bone Oncol.*, 2023, Vol. 42, 100501. doi: 10.1016/j.jbo.2023.100501.

11. Schousboe J.T., Shepherd J.A., Bilezikian J.P., Baim S. Executive summary of the 2013 International Society for Clinical Densitometry Position Development Conference on bone densitometry. *J. Clin. Densitom.*, 2013, Vol. 16, no. 4, pp. 455-466.

12. Ye C., Leslie W.D. Fracture risk and assessment in adults with cancer. *Osteoporos. Int.*, 2023, Vol. 34, no. 3, pp. 449-466.

Авторы:

Александрова Н.В. — к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории функциональных методов исследования, ультразвуковой диагностики и восстановительной терапии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной ревматологии имени А.Б. Зборовского», г. Волгоград, Россия

Сивордова Л.Е. — к.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории методов лечения и профилактики заболеваний суставов ФГБНУ «Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной ревматологии имени А.Б. Зборовского», г. Волгоград, Россия

Курчина Е.Р. — магистрант кафедры госпитальной терапии ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Волгоград, Россия

Ершов Я.Д. — магистрант кафедры госпитальной терапии ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Волгоград, Россия

Красильников А.Н. — к.м.н., доцент кафедры госпитальной терапии ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Волгоград, Россия

Полякова Ю.В. — к.м.н., научный сотрудник лаборатории методов лечения и профилактики заболеваний суставов ФГБНУ «Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной ревматологии имени А.Б. Зборовского», г. Волгоград, Россия

Authors:

Aleksandrova N.V., PhD (Medicine), Senior Researcher, Laboratory of Functional Research Methods, Ultrasound Diagnostics and Rehabilitation Therapy, A. Zborovskiy Research Institute of Clinical and Experimental Rheumatology, Volgograd, Russian Federation

Sivordova L.E., PhD (Medicine), Leading Researcher, Laboratory of Methods of Treatment and Prevention of Joint Diseases, A. Zborovskiy Research Institute of Clinical and Experimental Rheumatology, Volgograd, Russian Federation

Kurchina E.R., Master's Student, Department of Hospital Therapy, Volgograd State Medical University, Volgograd, Russian Federation

Ershov Ya.D., Master's Student, Department of Hospital Therapy, Volgograd State Medical University, Volgograd, Russian Federation

Krasilnikov A.N., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Hospital Therapy, Volgograd State Medical University, Volgograd, Russian Federation

Polyakova Yu.V., PhD (Medicine), Researcher, Laboratory of Methods of Treatment and Prevention of Joint Diseases, A. Zborovskiy Research Institute of Clinical and Experimental Rheumatology, Volgograd, Russian Federation

Поступила 29.03.2025

Отправлена на доработку 08.04.2025

Принята к печати 25.05.2025

Received 29.03.2025

Revision received 08.04.2025

Accepted 25.05.2025

ЦИРКУЛИРУЮЩИЕ ОПУХОЛЕВЫЕ СИГНАЛЬНЫЕ МОЛЕКУЛЫ Wnt/ β -CATENIN И WISP1, IL-8 КАК ПРОГНОСТИЧЕСКИЕ БИОМАРКЕРЫ ПРИ РАКЕ ЯИЧНИКОВ

Абакумова Т.В.¹, Долгова Д.Р.¹, Антонеева И.И.^{1,2}, Мягдиева И.Р.¹,
Генинг Т.П.¹, Генинг С.О.³, Бурханова Е.В.¹

¹ ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный университет», г. Ульяновск, Россия

² ГУЗ «Областной клинический онкологический диспансер», г. Ульяновск, Россия

³ ООО «Лучи Здоровье», Москва, Россия

Резюме. Данные эксперимента свидетельствуют о роли Wnt/ β -catenin сигналинга при прогрессировании рака яичников и устойчивости к химиотерапии. Построение прогностической модели риска исхода рака яичников на основании совокупности количественных показателей в сыворотке крови компонентов Wnt-сигналинга позволит дифференцировать стадии распространенного рака яичников и оценить риск метастазирования. Целью исследования была оценка прогностической значимости циркулирующих молекул Wnt-сигналинга – β -catenin и WISP1, IL-8 при распространенном раке яичников. В плазме крови 30 первичных пациенток с распространенным раком яичников III–IV стадии по FIGO методом ИФА оценивали уровень IL-8, β -catenin и WISP1 (пг/мл). Все обследованные были разделены на группы: I – платинорезистентная; II – платиночувствительная. В качестве контроля использовали плазму крови соматически здоровых женщин. Статистическая обработка проводилась с использованием Statistica 13. Анализ времени без прогрессирования пациентов проводился методом регрессии Кокса и Каплана–Мейера. Для выделения категорий на основе значений, используемых в прогнозировании, определяли точку разделения (cut-point) (Jamovi 2.4.14). Установлено значимое, по сравнению с контролем, повышение уровня β -catenin на III и IV стадиях заболевания. При этом не установлено значимых различий между изученными показателями в зависимости от чувствительности к стандартной химиотерапии. Мультивариантная модель Кокса показала возможность оценки риска развития IV стадии рака яичников по уровню β -catenin в плазме крови ($p = 0,033$). При этом риск развития IV стадии рака яичников возрастает при одновременно повышенных уровнях β -catenin (более 28,1 пг/мл) и WISP1 (более 445 пг/мл) в плазме крови ($R^2 = 0,451$, $\chi^2 = 28,4$, $p = 0,001$). Установлено резкое увеличение уровня сывороточного IL-8 на IV стадии (cut-point = 87,3 пг/мл, $p = 0,001$), и медиана времени без прогрессирования составляет 9,8 месяца [95% ДИ 8,1–14]. При повышении цир-

Адрес для переписки:

Абакумова Татьяна Владимировна
ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный
университет»
432017, Россия, г. Ульяновск,
ул. Архитектора Ливчака, 2.
Тел.: 8 (8422) 32-70-71.
E-mail: taty-abakumova@yandex.ru

Address for correspondence:

Tatyana V. Abakumova
Ulyanovsk State University
2 Arch. Livchak St
Ulyanovsk
432017 Russian Federation
Phone: +7 (8422) 32-70-71.
E-mail: taty-abakumova@yandex.ru

Образец цитирования:

Т.В. Абакумова, Д.Р. Долгова, И.И. Антонеева,
И.Р. Мягдиева, Т.П. Генинг, С.О. Генинг,
Е.В. Бурханова «Циркулирующие опухолевые
сигнальные молекулы Wnt/ β -catenin и WISP1, IL-8
как прогностические биомаркеры при раке яичников»
// Российский иммунологический журнал, 2025. Т. 28,
№ 3. С. 797–804.
doi: 10.46235/1028-7221-17091-CTS

© Абакумова Т.В. и соавт., 2025
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

T.V. Abakumova, D.R. Dolgova, I.I. Antoneeva,
I.R. Myagdieva, T.P. Gening, S.O. Gening, E.V. Burkhanova
“Circulating tumor signaling molecules Wnt/ β -catenin
and WISP1, IL-8 as prognostic biomarkers in ovarian
cancer”, Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy
Immunologicheskii Zhurnal, 2025, Vol. 28, no. 3, pp. 797–804.
doi: 10.46235/1028-7221-17091-CTS

© Abakumova T.V. et al., 2025
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.46235/1028-7221-17091-CTS

кулирующего IL-8 на 1 пг/мл отношение рисков увеличивается в 1,02 раза ($p < 0,001$). Таким образом, установленные уровни циркулирующих в крови IL-8, β -catenin могут быть рассмотрены как прогностические факторы при оценке прогрессирования рака яичников. При этом для дифференциальной диагностики III и IV стадий рака яичников статистическую значимость совместно демонстрировали β -catenin и WISP-1 плазмы крови.

Ключевые слова: рак яичников, сигнальный путь, циркулирующий β -catenin, WISP1, IL-8, время без прогрессирования

CIRCULATING TUMOR SIGNALING MOLECULES Wnt/ β -CATENIN AND WISP1, IL-8 AS PROGNOSTIC BIOMARKERS IN OVARIAN CANCER

Abakumova T.V.^a, Dolgova D.R.^a, Antoneeva I.I.^{a,b}, Myagdieva I.R.^a, Gening T.P.^a, Gening S.O.^c, Burkhanova E.V.^a

^a Ulyanovsk State University, Ulyanovsk, Russian Federation

^b Regional Clinical Oncology Center, Ulyanovsk, Russian Federation

^c Luchi Zdorovye LLC, Moscow, Russian Federation

Abstract. Experimental data suggest a role for Wnt/ β -catenin signaling in ovarian cancer progression and chemotherapy resistance. Development of a prognostic model for ovarian cancer outcomes based on circulating Wnt signaling molecules will allow staging of advanced ovarian cancer and assessment of metastasis risk. The aim of our study was to evaluate prognostic significance of circulating Wnt signaling molecules (β -catenin and WISP1, IL-8) in advanced ovarian cancer. The levels of IL-8, β -catenin and WISP1 (pg/mL) were assessed by ELISA technique in blood plasma of 30 primary patients with advanced ovarian cancer stage III-IV according to FIGO scale. All patients were divided into groups: I, platinum-resistant; II, platinum-sensitive. The control included plasma samples from somatically healthy women. Statistical processing was carried out using Statistica 13. Analysis of progression-free time was carried out using the Cox regression method, and the patient survival was assessed using the Kaplan–Meier method. A cutoff point was defined to assess categories based on the values used for prediction (Jamovi 2.4.14). A significant increase in β -catenin level against control was revealed at stages III and IV of malignant disease. However, no significant differences depending on sensitivity to standard chemotherapy were found for the studied parameters. The Cox model enabled us to estimate the risk of developing stage IV ovarian cancer based on β -catenin level in blood plasma ($p = 0.033$). Moreover, the risk of progression to stage IV ovarian cancer increases with elevation of both β -catenin (>28.1) and WISP1 levels (>445) in blood plasma ($R^2 = 0.451$, $\chi^2 = 28.4$, $p = 0.001$). A sharp increase in serum IL-8 levels was found at stage IV (cutoff-point = 87.3, $p = 0.001$), and the median progression-free time was 9.8 months [95% CI 8.1-14]. Upon increase in circulating IL-8 by 1 pg/ml, the odds ratio increases by 1.02 ($p < 0.001$). Hence, the established levels of circulating IL-8 and β -catenin in blood plasma may be considered prognostic factors for assessing progression of ovarian cancer. Meanwhile, for discerning stage III-IV ovarian cancer, a joint statistical significance was shown for β -catenin and WISP-1 in blood plasma.

Keywords: ovarian cancer, signaling pathway, circulating β -catenin, WISP1, IL-8, progression-free time

Работа выполнена при поддержке гранта РФФ 24-25-00269.

Введение

Эпителиальный рак яичников (РЯ) представляет собой самое смертоносное среди гинекологических злокачественных новообразований, с 5-летней выживаемостью 20-30% [10], на ранних стадиях которого практически отсутствуют специфические симптомы. В прогрессировании РЯ задействовано множество сигнальных путей,

в том числе сложный Wnt-сигналинг. На сегодня показано, что активность Wnt коррелирует со степенью злокачественности, химиорезистентностью, эпителиально-мезенхимальным переходом и плохим прогнозом у пациентов с РЯ [13].

β -catenin (CTNNB1) играет двойную роль в клетке. Он является ключевым эффектором сигнального пути Wnt/ β -catenin, будучи коактиватором транскрипции генов-мишеней TCF/LEF, и выступает ключевым компонентом клеточной адгезии на основе кадгерина. Данные литера-

туры подтверждают существование мембранного, цитоплазматического и ядерного пулов CTNNB1 [11]. Нарушение регуляции передачи сигналов Wnt/ β -catenin может вызываться мутациями различных компонентов пути. Считается, что мутации β -catenin являются наиболее распространенными изменениями при раке [3]. Было установлено, что передача сигналов Wnt/ β -catenin в опухолях связана со способностью поддерживать пролиферацию клеток и сохранять стволовость. Также была показана роль Wnt/ β -catenin-сигналинга в ангиогенезе, устойчивости к химиотерапии, метастазированию и метаболизме опухоли, а также в регуляции микроокружения опухоли [6]. Изменение сывороточного уровня β -catenin показано при колоректальном раке [7], остеонекрозе [5], заболеваниях печени [2]. WISP1 (CCN4), секретируемый белок семейства CCN, является нижестоящим геном-мишенью Wnt/ β -catenin-сигналинга. WISP1 экспрессируется в сердце, плаценте, почках, селезенке, легких, яичниках, головном мозге и как матриклеточный белок способен модулировать митоз, остановку роста и миграцию клеток, апоптоз и адгезию. Показано, что абберантная экспрессия WISP связана с различной патологией, в том числе раком. При этом белки WISP могут проявлять как про-, так и противоонкогенные свойства [8]. Повышенная экспрессия WISP выявлена в тканях и клетках РЯ и коррелировала с плохим прогнозом [4].

IL-8 — хемотаксический белок, который секретируется несколькими типами клеток, включая неопластические [12]. Показано, что патологическая сверхэкспрессия его коррелирует у онкологических больных с неблагоприятным прогнозом, чувствительностью к химиотерапии и сохраняется на протяжении всего заболевания. При этом экспрессия рецепторов IL-8 в нейтрофилах, макрофагах и эндотелиальных клетках показывает, что аутокринная и паракринная активность IL-8 стимулирует сигнальные пути, в том числе сигналинг Wnt/ β -catenin, способствующие пролиферации, ангиогенезу и миграции эндотелиальных клеток. Установлено, что молекулярные механизмы действия IL-8 способствуют канцерогенезу, развитию опухоли и метастазированию [12].

Целью исследования была оценка прогностической значимости циркулирующих молекул Wnt-сигналинга — β -catenin, WISP1 и IL-8 при распространенном РЯ.

Материалы и методы

В исследование были включено 30 пациенток (медиана возраста 60 лет), проходившие лечение в Областном клиническом онкологическом дис-

пансере г. Ульяновска в 2020–2023 гг. Критериями включения были впервые выявленный РЯ на III–IV стадии по FIGO (асцитная форма), цитологически верифицированная серозная high-grade аденокарцинома, общее состояние по шкале ECOG (Eastern Cooperative Oncology Group) 0±2 балла, подписанное информированное согласие и ожидаемая продолжительность жизни более 2 месяцев. На первом этапе лечения пациенты получали неoadъювантную химиотерапию (ХТ) по схеме TP (паклитаксел+цисплатин) от 2 до 4 курсов с интервалом в 3 недели. В последующем выполнялась циторедуктивная операция и адъювантная химиотерапия. Забор крови проводили до начала специфического противоопухолевого лечения. Группой сравнения была плазма соматически здоровых женщин, сравнимых по возрасту с экспериментальной группой (медиана — 56 лет). Исследование одобрено локальным этическим комитетом ИМЭиФК Ульяновского государственного университета (протокол № 6 от 15.06.2020 г.). Методом ИФА в плазме оценивали уровень IL-8 (Набор А-8762, Интерлейкин-8-ИФА-БЕСТ, АО «Вектор-Бест», Россия), бета-катенина (β -catenin) (Набор SEB021Hu Cloud-Clone Corp., КНР) и WISP1 (Набор SEG895Hu Cloud-Clone Corp., КНР).

В динамическом наблюдении на фоне и после завершения химиотерапии по схеме TP пациенты были разделены на 2 группы: I — прогрессирующее на фоне ХТ (платинорезистентная группа) и ранний рецидив; II — рецидив после 6 и более месяцев после окончания ХТ (платиночувствительная группа).

Совокупности количественных показателей, распределение которых отличалось от нормального, описывались при помощи значений медианы (Me) и нижнего и верхнего квартилей ($Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$). Исследование выполнялось проспективно, и оценивалось время без прогрессирования (ВБП) для оценки рисков раннего рецидива при распространенных формах РЯ. Анализ ВБП пациентов проводился методом регрессии Кокса и Каплана–Мейера. Для выделения категорий на основе значений, используемых в прогнозировании, определяли точку разделения (cut-point). Построение прогностической модели риска исхода злокачественного новообразования выполнялось при помощи метода бинарной логистической регрессии. Статистическая значимость полученной модели определялась с помощью критерия χ^2 . Качество прогностической модели, полученной с помощью ROC-анализа, оценивалось исходя из значений площади под ROC-кривой со стандартной ошибкой и 95%-ным доверительным интервалом (ДИ) и уровня статистической значимости (Jamovi 2.4.14).

Результаты и обсуждение

В результате проведенных исследований было установлено значимые по сравнению с контролем изменения уровня β -catenin, WISP1 и IL-8 в плазме крови больных с распространенным РЯ (табл. 1).

При этом не установлено значимых различий между изучаемыми показателями в плазме крови пациентов с рефрактерной и чувствительной опухолями уровня β -catenin ($p = 0,740$); уровня WISP1 ($p = 0,695$) и уровня IL-8 ($p = 0,449$).

Анализ полученных данных позволил установить статистически значимое увеличение в плазме крови пациенток с IV стадией заболевания по сравнению с показателями пациенток с III стадией РЯ уровня β -catenin ($p = 0,032$), WISP1 ($p = 0,007$) и IL-8 ($p = 0,001$).

Значительный объем данных подтверждает значимость Wnt/ β -catenin-сигналинга в створности РЯ, прогрессировании в злокачественную опухоль и устойчивости к химиотерапии. CTNNB1 (catenin- β 1) с одной стороны, является основным эффектором, работающим на более низких уровнях Wnt-сигналинга. С другой – он является ключевым компонентом адгезионных соединений на основе кадгерина.

Об активации β -catenin, как на уровне гена, так и на уровне белка при неопластических процессах свидетельствуют результаты ряда исследований *in vitro*, при раке шейки матки, раке толстой кишки, РЯ, при В-клеточной лимфоме, при раке легкого. Уровень β -catenin в плазме крови оценивали при остеонекрозе. При этом повышенный уровень биомаркера коррелировал со стадиями острого некроза головки бедренной кости [5]. При определении β -catenin при патологии печени показана корреляция его уровня с параметрами некротического процесса, с фазой заболевания вирусного гепатита В, что позволяет прогнозировать развитие гепатоцеллюлярной карциномы. Сывороточная гиперэкспрессия β -catenin является, по мнению ряда авторов, потенциальным маркером обнаружения у пациентов колоректального рака (КРР). Уровень β -catenin при КРР был повышен, но не коррелировал со стадией заболевания [7].

Нами установлен повышенный уровень β -catenin в сыворотке крови пациенток с распространенным РЯ. При этом показатели на IV клинической стадии заболевания были значимо ($p = 0,032$) выше показателей на III стадии. Мультивариантная модель Кокса показывает возмож-

ТАБЛИЦА 1. УРОВЕНЬ β -CATENIN, WISP1 И IL-8 В ПЛАЗМЕ ПАЦИЕНТОВ С РАСПРОСТРАНЕННЫМ РАКОМ ЯИЧНИКОВ, Ме ($Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$)

TABLE 1. PLASMA LEVELS OF β -CATENIN, WISP1 AND IL-8 IN PATIENTS WITH ADVANCED OVARIAN CANCER, Me ($Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$)

Группы Groups		Показатели Parameters		
		β -catenin, пг/мл/ β -catenin, pg/mL	WISP1, пг/мл/ WISP1, pg/mL	IL-8, пг/мл/ IL-8, pg/mL
Контроль Control n = 12		12,0 (7,85-13,80)	342,0 (302,0-378,0)	42,6 (35,5-45,5)
Рак яичников Ovarian cancer	III стадия stage III n = 14	17,3 (15,9-44,9) $p_1 = 0,003$	358,0 (320,0-445,0) $p_1 = 0,283$	26,7 (25,0-28,1) $p_1 = 0,059$
	IV стадия stage IV n = 16	19,9 (17,8-23,1) $p_1 = 0,001$ $p_2 = 0,032$	440,0 (434,0-522,0) $p_1 = 0,001$ $p_2 = 0,007$	115,0 (109,0-131,0) $p_1 = 0,001$ $p_2 = 0,001$
	Платиночувствительная группа Platinum sensitive group n = 13	17,9 (16,9-20,4) $p_1 = 0,042$	440,0 (348,0-483,0) $p_1 = 0,021$	55,9 (27,0-108,0) $p_1 = 0,033$
	Платинорезистентная группа Platinum-resistant group n = 17	17,7 (15,6-19,2) $p_1 = 0,045$	435,0 (377,0-494,0) $p_1 = 0,013$	109,0 (26,5-12,5) $p_1 = 0,029$

Примечание. p_1 – уровень статистической значимости различий по сравнению с аналогичными параметрами у здоровых доноров; p_2 – уровень статистической значимости различий по сравнению с показателями на предыдущей стадии заболевания.

Note. p_1 , level of statistical significance of differences compared with similar parameters in healthy donors; p_2 , the level of statistical significance of differences compared to the indicators at the previous stage of the disease.

ность оценки риска (ОР) развития IV стадии заболевания по уровню β -catenin в плазме крови (ОР 0,90 (95% ДИ 0,81-0,99, $p = 0,033$). Таким образом, уровень β -catenin в плазме крови может быть рассмотрен как прогностический фактор при оценке прогрессирования РЯ.

Цитозольный β -catenin является ключевым посредником между активацией сигналинга Wnt и повышением экспрессии WISP1 – секретиремого белка семейства CCN. WISP1 экспрессируется во многих органах, в том числе и в яичниках, и участвует в возникновении и развитии злокачественных новообразований различной локализации. Установлена повышенная экспрессия WISP1 в опухолевой ткани РЯ, что коррелировало с плохим прогнозом [8]. Повышенный уровень WISP1 в сыворотке крови обнаружен при раке предстательной железы [1].

Нами установлено, что уровень WISP в сыворотке крови пациенток на III клинической стадии РЯ достоверно не отличается от такового в контроле ($p = 0,283$). Однако при прогрессировании у пациентов на IV стадии РЯ сывороточный уровень WISP резко и значимо возрастает и превышает как контрольный ($p = 0,001$), так и уровень на III стадии заболевания ($p = 0,007$).

В унивариантном анализе логистической регрессии для дифференциальной диагностики между III и IV стадией РЯ статистическую значимость совместно демонстрировали β -catenin (ОР 0,718 95% ДИ 0,503-1,024, $p = 0,047$) и WISP1

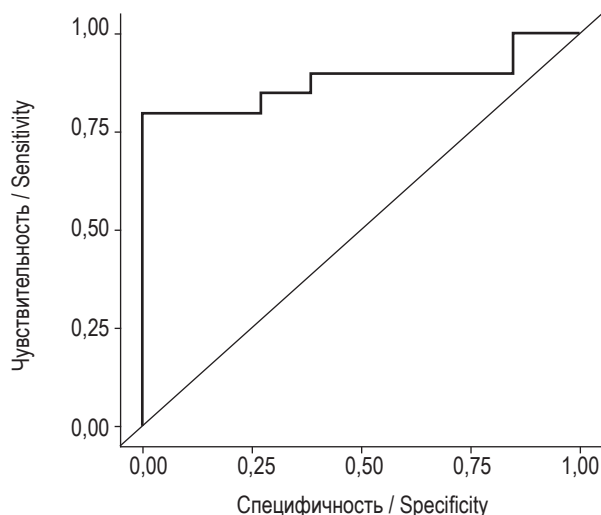


Рисунок 1. ROC-кривая для регрессионной модели дифференциальной диагностики III и IV стадии рака яичников с учетом β -catenin и WISP1 в плазме крови

Figure 1. ROC curve for the regression model of differential diagnosis of stage III and IV ovarian cancer taking into account β -catenin and WISP1 in blood plasma

плазмы крови (ОР 0,980 95% ДИ 0,968-0,993, $p = 0,002$). Площадь под кривой (AUC) такой модели составила 0,883, и IV стадия РЯ может быть диагностирована с 91,3% вероятностью (Spec. = 1,00, Sens. = 0,80) (рис. 1). Риск развития РЯ IV стадии возрастает при одновременно по-

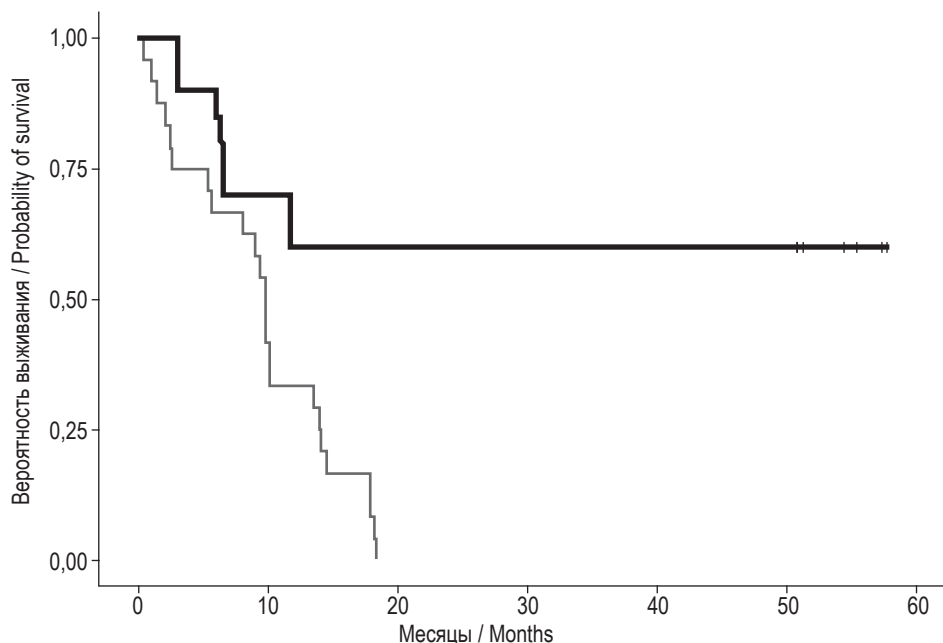


Рисунок 2. Кривая времени без прогрессирования пациентов с раком яичников в зависимости от уровня IL-8 (cut-point = 87,3 пг/мл) в плазме крови (Log-rank = 0,001)

Figure 2. Progression-free time curve of patients with ovarian cancer depending on the level of IL-8 (cut-point = 87.3 pg/mL) in blood plasma (Log-rank = 0.001)

вышенных уровнях β -catenin (более 28,1 пг/мл) и WISP1 (более 445 пг/мл) в плазме крови ($R^2 = 0,451$, $\chi^2 = 28,4$, $p = 0,001$).

Ранее было показано, что IL-8 как воспалительный хемокин способствует онкогенезу при злокачественных новообразованиях ряда локализаций. В лабораторных условиях IL-8 способствовал миграции раковых клеток, запускал программу эпителиально-мезенхимального перехода и активировал сигнальный путь Wnt/ β -catenin. Также установлено, что в тканях прогрессирующего серозного РЯ уровень экспрессии IL-8 связан со стадией РЯ, его злокачественностью и метастазами в лимфатических узлах [9]. При оценке нами показателей хемокина IL-8 в сыворотке крови было установлено значимое снижение его уровня по сравнению с контролем у пациентов с III стадией РЯ ($p = 0,059$) и резкое увеличение на IV стадии РЯ как по сравнению с контролем ($p = 0,001$), так и по сравнению с уровнем IL-8 у пациентов на III стадии заболевания ($p = 0,001$).

Нами установлено, что при повышении в сыворотке крови уровня IL-8 более 87,3 пг/мл, медиана ВБП составляет 9,8 месяца (95% ДИ 8,1-14); если сывороточный уровень ниже 87,3 пг/мл, медиана ВБП составляет 13,2 месяца (95% ДИ 11,8-55) (рис. 2).

При этом при повышении уровня циркулирующего IL-8 на 1 пг/мл, отношение рисков увеличивается в 1,02 раза (1,0-1,04, $p < 0,001$).

Выводы

Установленная точка разделения уровня IL-8 для пациентов с медианой ВБП 9,8 месяца и 13,2 месяца составила 87,3 пг/мл IL-8. Уровень β -catenin в плазме крови может быть рассмотрен как прогностический фактор при оценке риска метастазирования. При этом для дифференциальной диагностики III и IV стадий РЯ статистическую значимость совместно демонстрировали β -catenin и WISP-1 плазмы крови.

Список литературы / References

1. Chang A.C., Lin L.W., Chen Y.C., Chen P.C., Liu S.C., Tai H.C., Wu H.-C., Sung S.-Y., Lin T.-H., Tang C.-H. The ADAM9/WISP-1 axis cooperates with osteoblasts to stimulate primary prostate tumor growth and metastasis // *Int. J. Biol. Sci.*, 2023, Vol. 19, no. 3, pp. 760-771.
2. Duan L., Yang Q., Yang J., Hu Q., Wang B., Li P., Chen W. Identification of serum β -catenin as a biomarker in patients with HBV-related liver diseases. *J. Transl. Med.*, 2018, Vol. 16, no. 1, 265. doi: 10.1186/s12967-018-1645-x.
3. Gonzalez M.E., Brophy B., Eido A., Leonetti A.E., Djomehri S.I., Augimeri G., Carruthers N.J., Cavalcante R.G., Giordano F., Andò S., Nesvizhskii A.I., Fearon E.R., Kleer C.G. CCN6 suppresses metaplastic breast carcinoma by antagonizing Wnt/ β -catenin signaling to Inhibit EZH2-Driven EMT. *Cancer Res.*, 2024, Vol. 84, no. 19, pp. 3235-3249.
4. Graumann J., Finkernagel F., Reinartz S., Stief T., Brödje D., Renz H., Jansen J.M., Wagner U., Worzfeld T., von Strandmann E.P., Müller R. Multi-platform affinity proteomics identify proteins linked to metastasis and immune suppression in ovarian cancer plasma. *Front. Oncol.*, 2019, Vol. 9, 1150. doi: 10.3389/fonc.2019.01150.
5. Huang J., Zhou Y., Xiao W., Deng P., Wei Q., Lu W. Serum β -catenin changes vary among different stages of osteonecrosis of the femoral head: an exploratory biomarker study. *BMC Musculoskelet. Disord.*, 2022, Vol. 23, no. 1, 434. doi: 10.1186/s12891-022-05399-2.
6. Kalbasi A., Ribas A. Tumour-intrinsic resistance to immune checkpoint blockade. *Nat. Rev. Immunol.*, 2020, Vol. 20, pp. 25-39.
7. Li S., Huang M., Liu Q., Wang D., Wu R., Zhang X., Chen W., Duan L. Serum Expression of β -catenin is a potential detection marker in patients with colorectal cancer. *Dis. Markers*, 2019, Vol. 2019, 5070524. doi: 10.1155/2019/5070524
8. Li Y., Wang F., Liu T., Lv N., Yuan X., Li P. WISP1 induces ovarian cancer via the IGF1/ α v β 3/Wnt axis. *J. Ovarian Res.*, 2022, Vol. 15, no. 1, 94. doi: 10.1186/s13048-022-01016-x.
9. Liu Y., Li W., Luo J., Wu Y., Xu Y., Chen T., Zhang W., Fu F. Cysteine-rich intestinal protein 1 served as an epithelial ovarian cancer marker via promoting Wnt/ β -catenin-mediated EMT and tumour metastasis. *Dis. Markers*, 2021, Vol. 2021, 3566749. doi: 10.1155/2021/3566749.
10. Matulonis U.A., Shapira-Frommer R., Santin A.D., Lisyanskaya A.S., Pignata S., Vergote I., Raspagliesi F., Sonke G.S., Birrer M., Provencher D.M., Shouli J., Colombo N., González-Martín A., Oaknin A., Ottavanger P.B., Rudaitis V., Katchar K., Wu H., Keefe S., Ruman J., Ledermann J.A. Antitumor activity and safety of pembrolizumab in patients with advanced recurrent ovarian cancer: results from the phase II KEYNOTE-100 study. *Ann. Oncol.*, 2019, Vol. 30, no. 7, pp. 1080-1087.
11. Nelson W.J. The Glue that binds us: the hunt for the molecular basis for multicellularity. *Cell*, 2020, Vol. 181, no. 3, pp. 495-497.

12. Reddy S.U., Sadia F.Z., Vancura A., Vancurova I. IFN γ -Induced Bcl3, PD-L1 and IL-8 signaling in ovarian cancer: mechanisms and clinical significance. *Cancers (Basel)*, 2024, Vol. 16, no. 15, 2676. doi: 10.3390/cancers16152676.
13. Teeuwssen M., Fodde R. Wnt signaling in ovarian cancer stemness, EMT, and therapy resistance. *J. Clin. Med.*, 2019. Vol. 8, no. 10, 1658. doi: 10.3390/jcm8101658.

Авторы:

Абакумова Т.В. — д.б.н., доцент, профессор кафедры физиологии и патофизиологии, ведущий научный сотрудник Научно-исследовательского технологического института имени С.П. Капицы ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный университет», г. Ульяновск, Россия

Долгова Д.Р. — к.б.н., доцент, доцент кафедры физиологии и патофизиологии, старший научный сотрудник, директор Научно-исследовательского медико-биологического центра Научно-исследовательского технологического института имени С.П. Капицы ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный университет», г. Ульяновск, Россия

Антонеева И.И. — д.м.н., профессор, профессор кафедры физиологии и патофизиологии ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный университет»; заведующая отделением онкогинекологии ГУЗ «Областной клинический онкологический диспансер», г. Ульяновск, Россия

Authors:

Abakumova T.V., PhD, MD (Biology), Associate Professor, Professor, S.P. Kapitsa Research Technological Institute, Department of Physiology and Pathophysiology, Senior Researcher, S. Kapitsa Research Technological Institute, Ulyanovsk State University, Ulyanovsk, Russian Federation

Dolgova D.R., PhD (Biology), Associate Professor, Department of Physiology and Pathophysiology, Senior Researcher, Director, Research Medical and Biological Center, S. Kapitsa Research Technological Institute, Ulyanovsk State University, Ulyanovsk, Russian Federation

Antoneeva I.I., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Physiology and Pathophysiology, ILSU, Head of the Department of Oncogynecology of the Regional Clinical Oncological Center, Ulyanovsk State University; Head, Department of Oncogynecology, Regional Clinical Oncology Center, Ulyanovsk, Russian Federation

Мягдиева И.Р. — младший научный сотрудник кафедры физиологии и патофизиологии, старший научный сотрудник Научно-исследовательского технологического института имени С.П. Капицы 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

Генинг С.О. — к.м.н., врач-онколог ООО «Лучи Здоровье», Москва, Россия

Бурханова Е.В. — студент медицинского факультета по специальности «лечебное дело» ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный университет», г. Ульяновск, Россия

Myagdieva I.R., Junior Researcher, Department of Physiology and Pathophysiology, Junior Researcher, S. Kapitsa Research Technological Institute, 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

Gening S.O., PhD (Medicine), Oncologist, Luchi Zdorovye LLC, Moscow, Russian Federation

Burkhanova E.V., Student, Faculty of Medicine, Ulyanovsk State University, Ulyanovsk, Russian Federation

Поступила 13.02.2025

Отправлена на доработку 05.03.2025

Принята к печати 01.05.2025

Received 13.02.2025

Revision received 05.03.2025

Accepted 01.05.2025

ОЦЕНКА СУБПОПУЛЯЦИОННОГО СОСТАВА CD34⁺ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ПРИ ГЕМОБЛАСТОЗАХ

Пашкина Е.А., Актанова А.А., Быкова М.В., Скачков И.П.,
Пронкина Н.В., Денисова В.В., Козлов В.А.

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

Резюме. В течение последних десятилетий заболеваемость злокачественными заболеваниями крови неуклонно возрастает. В отличие от многих других видов злокачественных новообразований, гемобласты часто встречаются в молодом возрасте, а также являются основной причиной смертей среди всех патологий кроветворной ткани у пациентов детского возраста. Причиной гемобластога является мутационный процесс в гемопоэтических стволовых клетках, приводящий в дальнейшем к росту численности опухолевого клона и вытеснению здоровых клеток в занимаемых ими нишах, что приводит к ряду изменений в крови и костном мозге, в том числе необратимых. Целью данного исследования была оценка субпопуляционного состава плюрипотентных гемопоэтических стволовых клеток при гемобластазах и у условно-здоровых доноров. В исследование были включены пациенты с гемобластазами (n = 13), проходящие лечение в Клинике иммунопатологии НИИФКИ, в том числе пациенты с острым лимфобластным лейкозом (ОЛЛ) (n = 3), острым миелоидным лейкозом (ОМЛ) (n = 3) и пациенты с множественной миеломой (ММ) (n = 7), а также условно-здоровые доноры (n = 4). Оценка фенотипического состава гемопоэтических CD34⁺CD38⁻ плюрипотентных клеток проводилась с помощью проточной цитометрии, использовались следующие моноклональные антитела: CD34 APC (BioLegend, США), CD38 PE-Cy7 (ElabScience, Китай), CD45RA PerCP (ElabScience, Китай), CD90 APC-Cy7 (Cloud-Clone Corp., США), Lin⁻ (коктейль CD3/14/16/19/20/56) FITC (BioLegend, США). Проводилась оценка следующих популяций: гемопоэтические стволовые клетки (Lin⁻CD34⁺CD38⁻CD45RA⁻CD90⁺) и плюрипотентные предшественники (Lin⁻CD34⁺CD38⁻CD45RA⁻CD90⁻). Было показано, что у пациентов со всеми исследуемыми вариантами гемобластозов по сравнению с донорами возрастает относительное количество клеток с фенотипом Lin⁻CD34⁺CD38⁻CD45RA⁻CD90⁺, что соответствует гемопоэтическим стволовым клеткам, а не плюрипотентным клеткам-предшественникам. При этом количество плюрипотентных клеток-предшественников имеет тенденцию к снижению при остром миелоидном лейкозе. Обнаружено, что у пациентов с гемобластазами при сравнении с ус-

Адрес для переписки:

Пашкина Екатерина Александровна
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
фундаментальной и клинической иммунологии»
630099, Россия, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14.
Тел.: 8 (383) 227-01-35.
E-mail: pashkina.e.a@yandex.ru

Address for correspondence:

Ekaterina A. Pashkina
Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology
14 Yadrintsevskaya St
Novosibirsk,
630099 Russian Federation
Phone: +7 (383) 227-01-35.
E-mail: pashkina.e.a@yandex.ru

Образец цитирования:

Е.А. Пашкина, А.А. Актанова, М.В. Быкова,
И.П. Скачков, Н.В. Пронкина, В.В. Денисова,
В.А. Козлов «Оценка субпопуляционного состава CD34⁺
плюрипотентных гемопоэтических стволовых клеток
при гемобластазах» // Российский иммунологический
журнал, 2025. Т. 28, № 3. С. 805-810.
doi: 10.46235/1028-7221-17198-SPO

© Пашкина Е.А. и соавт., 2025
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

E.A. Pashkina, A.A. Aktanova, M.V. Bykova, I.P. Skachkov,
N.V. Pronkina, V.V. Denisova, V.A. Kozlov "Subpopulation
profile of CD34⁺ pluripotent hematopoietic stem cells in blood
malignancies", Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy
Immunologicheskii Zhurnal, 2025, Vol. 28, no. 3, pp. 805-810.
doi: 10.46235/1028-7221-17198-SPO

© Pashkina E.A. et al., 2025
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.46235/1028-7221-17198-SPO

ловно- здоровыми донорами наблюдаются изменения в субпопуляционном составе плюрипотентных гемопоэтических стволовых клеток.

Ключевые слова: гемобластозы, множественная миелома, острый лимфобластный лейкоз, острый миелоидный лейкоз, гемопоэтическая стволовая клетка

SUBPOPULATION PROFILE OF CD34⁺ PLURIPOTENT HEMATOPOIETIC STEM CELLS IN BLOOD MALIGNANCIES

Pashkina E.A., Aktanova A.A., Bykova M.V., Skachkov I.P.,
Pronkina N.V., Denisova V.V., Kozlov V.A.

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

Abstract. The incidence of malignant blood diseases has been steadily increasing over past decades. Unlike many other types of malignant neoplasms, blood cancers often occur at a young age, being also the main cause of death among all hematopoietic disorders in pediatric patients. Mutation events in hematopoietic stem cells are the cause of blood cancers which subsequently lead to increasing number of tumor clones and displacement of healthy cells in the niches they occupy thus leading to a number of changes in blood and bone marrow, including irreversible ones. The aim of this study was to assess the subpopulation composition of pluripotent hematopoietic stem cells in patients with blood cancers and healthy donors. The study included patients with blood cancers ($n = 13$), including acute lymphoblastic leukemia (ALL; $n = 3$), acute myeloid leukemia (AML; $n = 3$), and multiple myeloma (MM; $n = 7$), as well as healthy donors ($n = 4$). The phenotypic composition of hematopoietic CD34⁺CD38⁻ pluripotent cells was assessed by flow cytometry using the following monoclonal antibodies: CD34 APC (BioLegend, USA), CD38 PE-Cy7 (ElabScience, China), CD45RA PerCP (ElabScience, China), CD90 APC-Cy7 (Cloud-Clone Corp., USA), Lin⁻ (cocktail CD3/14/16/19/20/56) FITC (BioLegend, USA). The following populations were assessed: hematopoietic stem cells (Lin⁻CD34⁺CD38⁻CD45RA⁻CD90⁺) and pluripotent progenitors (Lin⁻CD34⁺CD38⁻CD45RA⁻CD90⁻). In patients with hemoblastoses, the relative number of cells with Lin⁻CD34⁺CD38⁻CD45RA⁻CD90⁺ phenotype proved to be increased, thus corresponding to hematopoietic stem cells, but not pluripotent progenitor cells. At the same time, the number of pluripotent progenitor cells tended to decrease in acute myeloid leukemia. We have observed some changes in the subpopulation composition of pluripotent hematopoietic stem cells in patients with blood cancers, when compared with healthy donors.

Keywords: hemoblastoses, multiple myeloma, acute lymphoblastic leukemia, acute myeloid leukemia, hematopoietic stem cell

Исследование выполнено при финансовой поддержке Правительства Новосибирской области, соглашение № МЛ-1 от 26 октября 2023 г.

Введение

Гемобластозы являются одним из распространенных видов онкологии, заболеваемость которыми неуклонно возрастает в последние десятилетия [1]. В отличие от многих других видов злокачественных новообразований, гемобластозы часто встречаются в молодом возрасте, а также являются основной причиной смертей среди всех патологий кроветворной ткани у пациентов детского возраста [2]. Все гемобластозы — это

результат мутационного процесса в гемопоэтических клетках, вследствие чего происходит неограниченный рост пула опухолевых клеток. Основной нишей, где может осуществляться злокачественное преобразование, является костный мозг, он же будет в дальнейшем играть ключевую роль в формировании опухолевого микроокружения при ряде гемобластозов [3, 4].

Тем не менее влияние как самого заболевания, так и различных вариантов терапии изучено мало. Немногочисленные данные свидетельствуют об изменениях, наблюдаемых при оценке состава различных ростков кроветворения, было показано, что при хроническом лимфолейкозе отмечалось повышение количества CD34⁺CD38⁻

плюрипотентных клеток у пациентов [5]. В то же время изменение субпопуляционного состава гемопоэтических стволовых клеток у пациентов может влиять на баланс между различными ростками кроветворения, что может в дальнейшем иметь важное прогностическое значение при восстановлении иммунной системы в ходе терапии и оценки риска развития рецидива.

Материалы и методы

В качестве материала исследования служили образцы гемопоэтических стволовых клеток пациентов с гемобластозами и условно-здоровых доноров. Критерии включения лиц в исследование: пациенты с гемобластозами обоего пола в возрасте 18-65 лет, проходящие лечение в клинике иммунопатологии НИИФКИ, либо здоровые лица обоего пола, выступающие в качестве доноров при проведении аллогенной трансплантации стволовых кроветворных клеток 18-65 лет без аутоиммунных, онкологических и хронических рецидивирующих вирусных инфекций; наличие письменного информированного согласия (пациенты и доноры). Всего в исследование вошло 4 донора и 13 пациентов, в том числе пациенты с острым лимфобластным лейкозом (ОЛЛ) (n = 3), острым миелоидным лейкозом (ОМЛ) (n = 3) и пациенты с множественной миеломой (ММ) (n = 7). На момент проведения исследования пациенты находились в практически полной ремиссии либо очень хорошей ремиссии, при этом минимальная остаточная болезнь не наблюдалась у пациентов с ОЛЛ, но при этом присутствовала у всех пациентов с ОМЛ и 6 пациентов с ММ. Мононуклеарные клетки костного мозга либо сепарат CD34⁺ клеток окрашивали конъюгированными с флуорохромами моноклональными антителами к поверхностным маркерам в рекомендуемом производителем количестве в течение 15 минут при комнатной температуре в темноте. Использовались следующие моноклональные антитела: коктейль к линейным маркерам: CD34 APC (BioLegend, США), CD38 PE-Cy7 (ElabScience, Китай), CD45RA PerCP (ElabScience, Китай), CD90 APC-Cy7 (CloudClone Corp., США), Lin⁻ (коктейль CD3, CD14, CD16, CD19, CD20, CD56) FITC (BioLegend, США). Далее клетки отмывали 1 мл раствора PBS с 0,02% EDTA и 0,5% FCS (Staining Buffer) при 1200 об/мин в течение 5 минут. Анализ проб проводили в 200 мкл Staining Buffer. Методом проточной цитометрии проводилась оценка следующих популяций: гемопоэтические стволовые клетки (Lin⁻CD34⁺CD38⁻CD45RA⁻CD90⁺) и плюрипо-

тентные предшественники (Lin⁻CD34⁺CD38⁻CD45RA⁻CD90⁻).

Анализ проводили на проточном цитофлуориметре на проточном цитофлуориметре LongCyte (Challenbio, Китай) в программном обеспечении ModelFlower (Challenbio, Китай).

Статистическую обработку данных проводили с помощью программного обеспечения GraphPad Prism 9.0.0. Тест Фридмана использовали для оценки различий между группами, где значение $p < 0,05$ считали статистически значимым.

Результаты и обсуждение

Нами была проведена оценка субпопуляционного состава Lin⁻CD34⁺CD38⁻ клеток, которые, как известно, среди CD34⁺ обладают плюрипотентностью. В первую очередь нами было обнаружено, что у пациентов с ММ, ОМЛ и ОЛЛ повышено количество истинных гемопоэтических стволовых клеток по сравнению с донорами (рис. 1).

Согласно литературным данным, популяция Lin⁻CD34⁺CD38⁻CD45RA⁻CD90⁺ обладает повышенной способностью к самообновлению [5]. Следовательно, при гемобластозах клетки в большей степени сохраняют фенотип данных клеток, а не стремятся к дифференцировке в том или ином направлении.

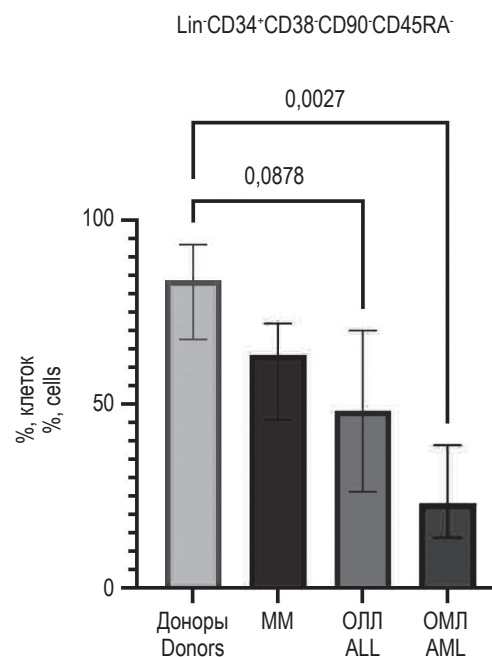


Рисунок 1. Плюрипотентные предшественники
Figure 1. Pluripotent progenitors

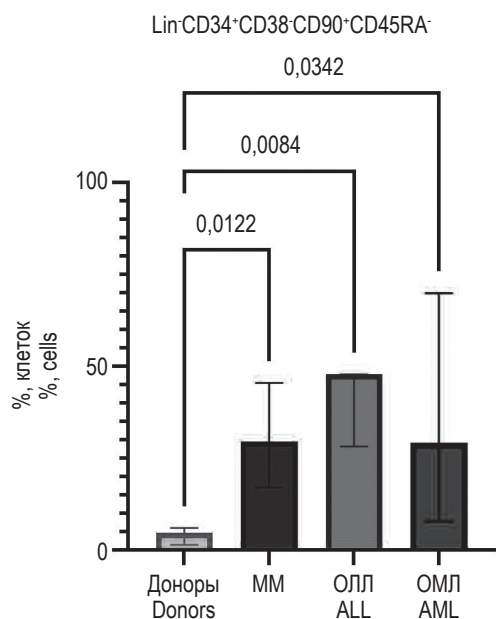


Рисунок 2. Плюрипотентные гемопоэтические стволовые клетки

Figure 2. Pluripotent hematopoietic stem cells

Далее мы оценивали относительное количество $\text{Lin}^{-}\text{CD34}^{+}\text{CD38}^{-}\text{CD45RA}^{-}\text{CD90}^{+}$ плюрипотентных клеток-предшественников у пациентов с гемобластозами и у здоровых доноров (рис. 2) среди популяции $\text{Lin}^{-}\text{CD34}^{+}\text{CD38}^{-}$.

Было обнаружено, что у пациентов с ОМЛ наблюдалось статистически значимое снижение

количества плюрипотентных предшественников. При этом у пациентов с ОЛЛ снижение указанных клеток носило характер тенденции ($p < 0,09$). Предположительно данная популяция может содержать в своем составе стволовые клетки лейкемии (СКЛ) при ОМЛ [5, 6, 7]. Также следует отметить, что при В-клеточном ОЛЛ в качестве СКЛ рассматривают $\text{CD19}^{+}\text{CD34}^{+}\text{CD38}^{-}$ клетки, обладающие схожим фенотипом [8].

Было показано, что среди $\text{CD34}^{+}\text{CD38}^{-}$ клеток у доноров значительно преобладают плюрипотентные предшественники, тогда как при гемобластозах данное преобладание сглаживается, и при ОМЛ доли гемопоэтических стволовых клеток и плюрипотентных клеток-предшественников, начавших дифференцировку, практически равны. Возможно, подобное изменение соотношения является следствием проводимой терапии либо формированием опухолевого микроокружения в тканях костного мозга, либо изначально измененным балансом в гемопоэзе у пациентов.

Выводы

Таким образом, было продемонстрировано, что у пациентов с гемобластозами при сравнении со здоровыми донорами наблюдаются изменения в субпопуляционном составе плюрипотентных гемопоэтических стволовых клеток.

Список литературы / References

1. Литвицкий П.Ф., Жевак Т.Н. Гемобластоzy. Лейкозы лимфоидного происхождения // Вопросы современной педиатрии. 2016. Т. 15, № 5. С. 457-470. [Litvitsky P.F., Zhevak T.N. Hematological malignancies. lymphocytic leukaemia. *Voprosy sovremennoy pediatrii = Current Pediatrics*, 2016, Vol. 15, no. 5, pp. 457-470. (In Russ.)]
2. Мовчан Л.В., Шман Т.В. Анализ количества клеток с фенотипом $\text{CD34}^{+}\text{CD38}^{-}$ и $\text{CD34}^{+}\text{CD38}^{-}\text{CD19}^{+}$ в качестве потенциальных лейкоэмических стволовых клеток при остром лимфобластном лейкозе у детей // Проблемы здоровья и экологии, 2011. №2S. С. 66-69. [Movchan L.V., Shman T.V. Analysis of the number of cells with $\text{CD34}^{+}\text{CD38}^{-}$ and $\text{CD34}^{+}\text{CD38}^{-}\text{CD19}^{+}$ phenotypes as potential leukemic stem cells in acute lymphoblastic leukemia in children. *Problemy zdorovya i ekologii = Health and Ecology Issues*, 2011, no. 2S, pp. 66-69. (In Russ.)]
3. Ругаль В.И., Бессмельцев С.С., Семенова Н.Ю., Грицаев С.В., Кострома И.И., Енукашвили Н.И., Чубарь А.В., Иволгин Д.А. Характеристика микроокружения костного мозга при множественной миеломе до и после терапии // Сибирский научный медицинский журнал, 2019. Т. 39, № 1. С. 112-118. [Rugal V.I., Bessmeltsev S.S., Semenova N.Yu., Gritsaev S.V., Kostroma I.I., Enukashvili N.I., Chubar A.V., Ivolgin D.A. Characteristics of bone marrow microenvironment in multiple myeloma before and after treatment. *Sibirskiy nauchnyy meditsinskiy zhurnal = Siberian Scientific Medical Journal*, 2019, Vol. 39, no. 1, pp. 112-118. (In Russ.)]
4. Christopherson K.W., Paganessi L.A., Rhoades D.R., Dillon H.M., Gezer S., Larson M.L., Fung H.C., Gregory S.A. Abnormally high levels of circulating $\text{CD34}^{+}\text{CD38}^{-}$, $\text{CD34}^{+}\text{CD38}^{+}$, and CD10^{+} hematopoietic stem and progenitor cells in the peripheral blood of B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL) patients suggest the presence of additional therapeutic target cells. *Blood*, 2007, Vol. 110, no. 11, 4711. doi: 10.1182/blood.V110.11.4711.4711.
5. Dander E., Palmi C., D'Amico G., Cazzaniga G. The bone marrow niche in B-cell acute lymphoblastic leukemia: the role of microenvironment from pre-leukemia to overt leukemia. *Int. J. Mol. Sci.*, 2021, Vol. 22, no. 9, 4426. doi: 10.3390/ijms22094426.

6. Reuvekamp T., Ngai L.L., den Hartog D., Carbaat-Ham J., Fayed M.M.H.E., Scholten W.J., Mocking T.R., Chitu D.A., Pabst T., Klein S.K., Stussi G., Griskevicius L., Breems D., van Lammeren-Venema D., Boersma R., Ossenkoppele G.J., van de Loosdrecht A.A., Bachas C., Huls G., de Leeuw D.C., Cloos J. CD34⁺CD38⁻ leukemia stem cells predict clinical outcomes in acute myeloid leukemia patients treated non-intensively with hypomethylating agents. *Leukemia*, 2025, Vol. 39, no. 4. pp. 972-975.
7. Zeijlemaker W., Grob T., Meijer R., Hanekamp D., Kelder A., Carbaat-Ham J.C., Oussoren-Brockhoff Y.J.M., Snel A.N., Veldhuizen D., Scholten W.J., Maertens J., Breems D.A., Pabst T., Manz M.G., van der Velden V.H.J., Slomp J., Preijers F., Cloos J., van de Loosdrecht A.A., Löwenberg B., Valk P.J.M., Jongen-Lavrencic M., Ossenkoppele G.J., Schuurhuis G.J. CD34⁺CD38⁻ leukemic stem cell frequency to predict outcome in acute myeloid leukemia. *Leukemia*, 2019, Vol. 33, no. 5. pp. 1102-1112.
8. Zhang N., Wu J., Wang Q., Liang Y., Li X., Chen G., Ma L., Liu X., Zhou F. Global burden of hematologic malignancies and evolution patterns over the past 30 years. *Blood Cancer J.*, 2023, Vol. 13, no. 1. 82. doi: 10.1038/s41408-023-00853-3.

Авторы:

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

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

Быкова М.В. — младший научный сотрудник лаборатории клинической иммунопатологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Authors:

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

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

Bykova M.V., Junior Researcher, Laboratory of Clinical Immunopathology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Скачков И.П. — лаборант-исследователь лаборатории клинической иммунопатологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Пронкина Н.В. — к.м.н., заведующая лабораторией клинической иммунологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Денисова В.В. — к.м.н., заведующая отделением гематологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

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

Skachkov I.P., Laboratory Assistant, Laboratory of Clinical Immunopathology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Pronkina N.V., PhD (Medicine), Head, Laboratory of Clinical Immunology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Denisova V.V., PhD (Medicine), Head, Department of Hematology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

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

Поступила 30.03.2025
Принята к печати 11.05.2025

Received 30.03.2025
Accepted 11.05.2025

ЭКЗОСОМАЛЬНЫЕ ТЕТРАСПАНИНЫ: РОЛЬ CD63 И CD81 В ПАТОГЕНЕЗЕ ИНФАРКТА МИОКАРДА

Ревякина М.О., Кабина Н.А.

ФГБОУ ВО «Орловский государственный университет имени И.С. Тургенева», г. Орел, Россия

Резюме. Сердечно-сосудистые заболевания продолжают оставаться одной из основных глобальных проблем мировой системы здравоохранения, с сохраняющимся стабильно высоким уровнем распространенности и смертности. В патогенезе и прогрессировании кардиоваскулярных заболеваний решающую роль играют сложные межклеточные коммуникации, поддерживающиеся циркулирующими экзосомами, признанными важными участниками иммунопатогенеза атеросклероза и ишемической болезни сердца. Учитывая, что тетраспанины (CD63 и CD81) получили широкое признание в качестве экзосомальных маркеров, целью нашего исследования стало определение и оценка динамики сывороточной продукции экзосомальных тетраспанинов CD63 и CD81 в 1-е и 7-е сутки течения острого инфаркта миокарда. В проводимое исследование вошли 40 пациентов с острым инфарктом миокарда (ОИМ) в возрасте $54,29 \pm 5,45$ года и 10 условно здоровых субъектов, сопоставимых по возрасту и полу. При ОИМ выявлено два типа динамики тетраспаниновой продукции при остром ишемическом процессе в миокарде. 1-й тип, характеризующийся исходно низкими значениями тетраспанина CD63 по сравнению со здоровыми лицами и сопровождающийся увеличением выработки/высвобождения экзосомального CD63 на 7-е сутки; 2-й тип — с более высокими значениями CD63, превышающими показатели здоровых лиц в 1-е сутки патологического процесса со снижением их концентрации к 7-м суткам ОИМ. Проведенный нами корреляционный анализ тетраспанина CD63 позволил установить связи с возрастом, уровнем холестерина, ЛПНП, триглицеридов, а также с числом тромбоцитов и лейкоцитов. Уровень CD81 у пациентов с ОИМ в сыворотке крови был достоверно ниже, чем у здоровых лиц. Установлены особенности динамики продукции, позволившие нам классифицировать пациентов по типам: 1-й тип — с возрастанием концентрации экзосомального CD81 в сыворотке и последующим достижением целевого уровня тетраспанина, характерного для здоровых лиц; 2-й тип — со снижением концентрации по сравнению с исходным уровнем, что сочеталось с более высокой частотой неблагоприятных сердечно-сосудистых событий. Проведенный корреляционный анализ сывороточного CD81 позволил установить корреляционные связи с уровнем лейкоцитов и скоростью оседания эритроцитов, и степенью ожирения. Экзосомальный профиль циркулирующих тетраспанинов CD63 и CD81 у лиц с ОИМ отличается по своим количественным характеристикам от здоровых субъектов, а также характеризуется различными типами динамики тетраспаниновой продукции в течение первой недели госпитального периода инфаркта миокарда.

Ключевые слова: инфаркт миокарда, ишемическая болезнь сердца, экзосомы, CD63, CD81, тетраспанины

Адрес для переписки:

Ревякина Мария Олеговна
ФГБОУ ВО «Орловский государственный университет
имени И.С. Тургенева»
302026, Россия, г. Орел, ул. Комсомольская, 95.
Тел.: 8 (920) 089-69-90.
E-mail: mopltnikova@mail.ru

Address for correspondence:

Mariya O. Reviakina
I. Turgenev Orel State University
95 Komsomolskaya St
Orel
302026 Russian Federation
Phone: +7 (920) 089-69-90.
E-mail: mopltnikova@mail.ru

Образец цитирования:

М.О. Ревякина, Н.А. Кабина «Экзосомальные тетраспанины: роль CD63 и CD81 в патогенезе инфаркта миокарда» // Российский иммунологический журнал, 2025. Т. 28, № 3. С. 811–816.
doi: 10.46235/1028-7221-17211-ETT

© Ревякина М.О., Кабина Н.А., 2025
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

M.O. Reviakina, N.A. Kabina "Exosomal tetraspanins: the role of CD63 and CD81 in pathogenesis of myocardial infarction", Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2025, Vol. 28, no. 3, pp. 811–816.
doi: 10.46235/1028-7221-17211-ETT

© Reviakina M.O., Kabina N.A., 2025
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.46235/1028-7221-17211-ETT

EXOSOMAL TETRASPANINS: THE ROLE OF CD63 AND CD81 IN PATHOGENESIS OF MYOCARDIAL INFARCTION

Reviakina M.O., Kabina N.A.

I. Turgenyev Orel State University, Orel, Russian Federation

Abstract. Cardiovascular diseases are one of the major global health problems with high prevalence and mortality rates. Complex intercellular communications supported by circulating exosomes, recognized as important participants in the immunopathogenesis of atherosclerosis and coronary heart disease, thus playing a crucial role in pathogenesis and progression of cardiovascular diseases. Presuming tetraspanins (CD63 and CD81) being widely recognized as exosomal markers, the purpose of our study was to determine and evaluate the time dynamics of serum exosomal tetraspanins CD63 and CD81 production on 1st and 7th days after acute myocardial infarction. The study included 40 patients with acute myocardial infarction (AMI) aged 54.29 ± 5.45 years and 10 healthy persons, matched for age and gender. Two types of tetraspanin dynamics were revealed following AMI in acute ischemic process in the myocardium. Type 1 is characterized by initially low values of tetraspanin CD63, compared to healthy individuals, and is accompanied by an increased production/release of exosomal CD63 on day 7; type 2 is characterized by higher CD63 values, exceeding reference values on day 1 after AMI, with its decrease by day 7. Our correlation analysis of tetraspanin CD63 allowed us to establish links with age, cholesterol, LDL, triglycerides and the number of platelets and leukocytes. The CD81 level in blood serum of AMI patients was significantly lower than in healthy individuals. The identified features of the production dynamics allowed us to classify patients by distinct response types: (1) with increase in serum exosomal CD81 and subsequent achievement of the target tetraspanin level typical for healthy individuals; (2) with a decreased concentration against initial level, associated with higher frequency of adverse cardiovascular events. The correlation analysis of serum CD81 allowed us to establish correlations with leukocyte counts, erythrocyte sedimentation rate and obesity grade. Exosomal profile of circulating CD63 and CD81 in individuals with AMI differs quantitatively from healthy subjects, being characterized by different types of dynamics of tetraspanin production during the first week of myocardial infarction.

Keywords: myocardial infarction, ischemic heart disease, exosomes, CD63, CD81, tetraspanins

Работа выполнена в ОГУ имени И.С. Тургенева в рамках государственного задания № 075-00196-24-02 на 2024 год и на плановый период 2025 и 2026 годов от 01.04.2024 г., проект № FSGN-2024-0007 (1023110800218-7-3.2.4;3.1.3;2.6.1).

Введение

Сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) продолжают оставаться одной из основных глобальных проблем здравоохранения, несмотря на значительные достижения науки в области их лечения и профилактики [3, 12]. Согласно прогнозам, ожидается увеличение глобальной распространенности этих заболеваний на 90,0% и смертности от них – на 73,4% на период с 2025 по 2050 год [3, 12]. Основными факторами риска прогнозируемого увеличения смертности и инвалидизации, помимо социальных причин, называются связанные с атеросклеротическими поражениями сосудов ишемическая болезнь сердца, инсульт и гипертония [3]. В патогенезе и прогрессировании ССЗ решающую роль играют сложные коммуникации между эндотелиальными, гладкомышечными, иммунными клетками,

кардиомиоцитами и фибробластами. Эти межклеточные взаимодействия обеспечиваются разнообразными механизмами, одним из которых является паракринная передача сигнала, опосредованная внеклеточными везикулами. В связи с этим в настоящее время привлекает внимание изучение циркулирующих экзосом в качестве медиаторов активации воспалительных реакций и доставки биологически активных молекул при модуляции фенотипа клеток [4, 8]. Известно о роли внеклеточных везикул в генезе атеросклероза, ишемической болезни сердца и острого инфаркта миокарда [5, 6, 7, 9], однако в экспериментах выявляются разнообразные и часто противоречивые биологические эффекты экзосом, что обуславливает актуальность дальнейших исследований в этой области.

К экзосомам относят подгруппу внеклеточных везикул, характеризующихся размерами от 30 нм до 150 нм, включающих в себя обширный и разнообразный перечень биомолекул – белков, липидов, нуклеиновых кислот, состав которых определяется видом и физиологическим состоянием клеток различного происхождения [6]. Кроме того, тетраспанины (CD9, CD63 и CD81)

получили широкое признание в качестве экзосомальных маркеров благодаря конститутивной экспрессии на их поверхности и участию в биогенезе экзосом [4], а тетраспаниновая сеть является платформой передачи сигналов и взаимодействия с белками-партнерами: рецепторами и корецепторами, интегринами, холестерином, способствуя организации мембранных структур и принимая участие в регулировании межклеточных и внутриклеточных сигналов [11].

В литературе имеются данные, свидетельствующие о значимой роли экзосом, маркируемых тетраспанинами CD63 (лизосомальный мембранный гликопротеин-3, LAMP3, LIMP-1, ME491, Pltgp40) и CD81 (TAPA-1, Target of the Antiproliferative Antibody 1, Tetraspanin-28, Tspan-28) при различных заболеваниях, однако для уточнения их роли в иммунопатогенезе атеросклероза, ишемической болезни сердца, а также острых сердечно-сосудистых событий требуются дополнительные исследования.

Цель — определение и оценка динамики сывороточной продукции экзосомальных тетраспанинов CD63 и CD81 в 1-е и 7-е сутки течения острого инфаркта миокарда.

Материалы и методы

В проводимое исследование вошли 40 пациентов с острым инфарктом миокарда (ОИМ), госпитализированные в региональный сосудистый центр Бюджетного учреждения здравоохранения Орловской области «Орловская областная клиническая больница» и 10 условно здоровых лиц, сопоставимых по возрасту и полу. Клинико-лабораторная характеристика больных с острым инфарктом миокарда представлена в таблице 1.

Протокол исследования одобрен локальным этическим комитетом ФГБОУ ВО «ОГУ им. И.С. Тургенева» (Протокол № 31 от 27.06.2024).

Статистический анализ проводился с использованием программы StatTech 4.8.0 (ООО «Статтех», Россия, 2025).

Для определения и оценки динамики изменений сывороточной концентрации экзосомальных тетраспанинов в течение госпитального периода острого инфаркта миокарда использовались готовые наборы для сэндвич-ИФА по определению TSPAN30/CD63 (тетраспанина 30) с диапазоном определения 0,156–10 нг/мл и чувствительностью набора 0,094 нг/мл и TSPAN28/CD81 (тетраспанина 28), имеющего диапазон измерения 0,313–20 нг/мл с чувствительностью 0,188 нг/мл. Используемые ИФА-наборы предназначены для специфического связывания с CD63 и CD81 в сыворотке крови без очевидных перекрестных реакций с другими аналогами.

Результаты и обсуждение

Согласно современным представлениям, новые потенциальные биомаркеры ишемической болезни сердца включают секретируемые внеклеточные везикулы, присутствующие во всех биологических жидкостях, включая периферическую кровь, и подразделяются на экзосомы происходящие из эндосомальной системы и микровезикулы, которые напрямую сбрасываются плазматическими мембранами клеток.

Основными эпитопами экзосомальной поверхности являются тетраспанины CD9, CD63 и CD81. Наши предыдущие исследования были сосредоточены на анализе роли CD9 при инфаркте миокарда [1], данная работа является продолжением темы по изучению экзосомального профиля больных ишемической болезнью сердца и направлено на установление диагностической значимости тетраспанинов CD63 и CD81.

Как известно, тетраспанин CD63 представляет собой мембранный белок, играющий важную роль в различных клеточных процессах, включая адгезию, миграцию и внутриклеточную сигнализацию, а также участвующий в формировании тетраспаниновой сети, определяющей различные физиологические процессы, включая кооперацию клеток в иммунном ответе [2, 7, 10]. В контексте ишемической болезни сердца изучается роль экзосомального CD63 при воспалении, апоптозе кардиомиоцитов и ремоделировании миокарда [2, 7, 10]. Вместе с тем, учитывая, что в различных исследованиях получены неоднозначные данные о тетраспанине CD63 при острых коронарных событиях, нами были изучены особенности сывороточного уровня CD63 у пациентов с острым инфарктом миокардом.

Анализ полученных результатов позволил выявить среди пациентов два типа динамики тетраспаниновой продукции при остром ишемическом процессе в миокарде. 1-й тип, характеризующийся исходно низкими значениями тетраспанина CD63 по сравнению со здоровыми лицами ($p < 0,05$) и сопровождающийся увеличением выработки/высвобождения экзосомального CD63 на 7-е сутки, а также 2-й тип — с более высокими значениями CD63, превышающими показатели здоровых лиц в 1-е сутки патологического процесса ($p < 0,05$) со снижением их концентрации к 7-м суткам ОИМ (рис. 1). Увеличение концентрации CD63 на 7-е сутки с момента госпитализации, вероятно может быть связано высвобождением микровезикул вследствие клеточного стресса, который резко возрастает в результате ишемического повреждения миокарда после окклюзии коронарных артерий и последующего развития острого воспалительного ответа.

ТАБЛИЦА 1. КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПАЦИЕНТОВ С ОСТРЫМ ИНФАРКТОМ МИОКАРДА (НА МОМЕНТ ГОСПИТАЛИЗАЦИИ)

TABLE 1. CLINICAL AND LABORATORY CHARACTERISTICS OF PATIENTS WITH ACUTE MYOCARDIAL INFARCTION (AT THE TIME OF HOSPITALIZATION)

Параметр Parameter	M±SD / Me (Q _{0,25} -Q _{0,75})	Параметр Parameter	M±SD / Me (Q _{0,25} -Q _{0,75})
Возраст, лет Age, years	54,29±5,45	Лейкоциты, 10⁹/л Leukocytes, 10 ⁹ /L	7,85±1,95
Пол мужской/женский, n Gender: male/female, n	30/10	СОЭ (мм/час) ESR (mm/hour)	12,70±6,18
Общий холестерин (ммоль/л) Total cholesterol (mmol/L)	5,72±1,14	Билирубин общий, мкмоль/л Total bilirubin, μmol/L	12,14±8,71
ЛПНП (ммоль/л) LDL (mmol/L)	3,45 [2,57; 4,47]	Белок общий, г/л Total protein, g/L	67,75±7,18
ЛПОНП (ммоль/л) VLDL (mmol/L)	0,55 [0,45; 0,66]	Патологический зубец Q на ЭКГ, n Pathological Q wave on ECG, n	25
ЛПВП (ммоль/л) HDL (mmol/L)	1,05 [0,92; 1,18]	Подъем сегмента ST на ЭКГ, n ST segment elevation on ECG, n	30
Глюкоза (мкмоль/л) Glucose (μmol/L)	5,10±0,64	Локализация ИМ, % MI localization, %	Нижней стенки – 50% Нижнебоковая – 30% Передне-перегородочная – 15% Переднебоковая – 15% Lower wall – 50% Lower lateral – 30% Anterior septal – 15% Anterolateral – 15%
Гемоглобин (г/л) Hemoglobin (g/L)	131,38±16,16		

Примечание. Данные представлены в виде среднего и ошибки среднего (M±SD (95% ДИ), при нормальном распределении данных; а также в виде медианы и 1-го, 3-го квартилей (Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})), при ненормальном распределении данных.

Note. The data are presented as the mean and error of the mean (M±SD (95% CI), with a normal data distribution, and as the median and quartiles 1, 3 (Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})), with an abnormal distribution.

Проведенный нами корреляционный анализ сывороточного уровня тетраспанина CD63 позволил установить целый ряд прочных, статистически значимых связей со следующими клинико-лабораторными показателями пациентов: возрастом ($r = 0,88$; $p < 0,05$), уровнем холестерина ($r = 0,71$; $p < 0,05$), ЛПНП ($r = 0,74$; $p < 0,05$) и триглицеридов ($r = 0,81$; $p < 0,05$), что согласуются с работами В. Kestecher и соавт. о тесной связи между CD63⁺ экзосомами и холестериновым обменом при атеросклеротическом процессе [7].

Учитывая, что большинство экзосомальных везикул высвобождаются из тромбоцитов и лей-

коцитов, заслуживают внимания полученные данные о статистически значимой зависимости CD63 с числом тромбоцитов ($r = 0,69$; $p < 0,05$) и лейкоцитов ($r = 0,45$; $p < 0,05$) общего анализа периферической крови.

Проведенные в последнее десятилетие исследования свидетельствуют об участии экзосомального тетраспанина CD81 в генезе ишемической болезни сердца посредством его специфической активации в эндотелии сосудов при формировании атеросклеротических бляшек [2, 4], обусловили наш интерес к изучению количественного

содержания данного белка у пациентов с острым инфарктом миокарда.

Как видно из данных, представленных на рисунке 1, у всех пациентов с ОИМ исходный уровень CD81 в сыворотке крови составил 5,97 (5,64–8,06) нг/мл, что было достоверно ниже, чем у здоровых лиц ($p < 0,05$). Стоит отметить, что при анализе уровня тетраспанина CD81 у пациентов с ОИМ в динамике, установлены характерные особенности, позволившие нам классифицировать пациентов по типам: 1-й тип — с возрастанием концентрации экзосомального CD81 в сыворотке до 8,52 (6,3–11,94) нг/мл и последующим достижением целевого уровня тетраспанина, характерного для здоровых лиц, в более чем 50% случаев; 2-й тип — со снижением концентрации данного протеина в сравнении с исходным уровнем, при котором ни у одного из пациентов не был достигнут целевой уровень экзосомального тетраспанина CD81, регистрируемый у здоровых лиц (рис. 1), что сочеталось с более высокой частотой неблагоприятных сердечно-сосудистых событий, в виде нарушения ритма и проводимости, возникших в течение госпитального периода у данной группы пациентов.

Проведенный корреляционный анализ сывороточного CD81 с клинико-лабораторными данными позволил установить отрицательные корреляционные связи с уровнем лейкоцитов и скоростью оседания эритроцитов ($r = -0,69$; $r = -0,57$; $p < 0,05$), что подтверждает данные об участии экзосомального CD81 в острофазовых реакциях и оказывающего модулирующее действие на процессы воспалительного повреждения тканей. Отдельного внимания заслуживают данные о выявленной корреляции CD81 с индексом массы тела пациентов ($r = 0,71$; $p < 0,05$).

Выводы

1. Экзосомальный профиль циркулирующих тетраспанинов CD63 и CD81 у пациентов с острым инфарктом миокарда отличается по своим количественным характеристикам от здоровых субъектов.

2. При ОИМ установлено два типа динамики тетраспаниновой продукции: 1-й тип, характеризующийся исходно низкими значениями тетраспанина CD63 и сопровождающийся увеличением выработки/высвобождения экзосомального CD63 на 7-е сутки; 2-й тип — с более высокими значениями CD63, превышающими показатели здоровых лиц в 1-е сутки патологического процесса со снижением их концентрации к 7-м суткам ОИМ.

3. Выявлены особенности продукции экзосомального CD81 у больных с инфарктом миокарда, позволившие классифицировать па-

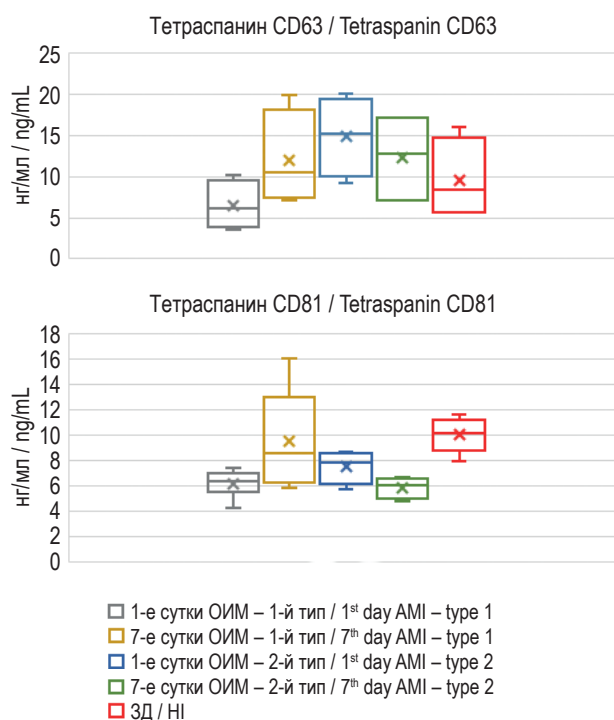


Рисунок 1. Динамика концентраций тетраспанинов CD63 и CD81 в сыворотке крови пациентов с острым инфарктом миокарда

Figure 1. Dynamics of concentrations of tetraspanins CD63 and CD81 in the blood serum of patients with acute myocardial infarction

циентов по типам: 1-й тип — с возрастанием концентрации экзосомального CD81 в сыворотке и последующим достижением целевого уровня тетраспанина, характерного для здоровых лиц; 2-й тип — со снижением концентрации, по сравнению с исходным уровнем, в сочетании с более высокой частотой неблагоприятных сердечно-сосудистых событий.

Таким образом, полученные результаты демонстрируют потенциальную осуществимость клинического лабораторного анализа посредством экзосомального профилирования на ранней стадии острого инфаркта миокарда, и предполагают возможность того, что данные биомаркеры могут играть вспомогательную роль в диагностике острого инфаркта миокарда, когда первичное коронарное вмешательство имеет более высокие шансы повлиять на исход заболевания и прогнозирование неблагоприятных сердечно-сосудистых событий. Кроме того, оценка экзосомального профиля пациентов с нестабильной стенокардией и хронической ишемической болезнью сердца может стать предметом будущих исследований с целью ранней предиктивной диагностики.

Список литературы / References

1. Снимщикова И.А., Кабина Н.А., Плотникова М.О., Киселева М.В. Перспективы изучения тетраспанина CD9 в патогенезе инфаркта миокарда // Вестник уральской медицинской академической науки, 2024. Т. 21, № 3. С. 223-232. [Snimshhikova I.A., Kabina N.A., Plotnikova M.O., Kiseleva M.V. Prospects for studying tetraspanin CD9 in the pathogenesis of myocardial infarction. *Vestnik uralskoy meditsinskoy akademicheskoy nauki = Journal of Ural Medical Academic Science*, 2024, Vol. 21, no. 3, pp. 223-232. (In Russ.)]
2. Burrello J., Bolis S., Balbi C., Burrello A., Provati E., Caporali E., Gauthier L.G., Peirone A., d'Ascenzo F., Monticone S., Barile L., Vassalli G. An extracellular vesicle epitope profile is associated with acute myocardial infarction. *J. Cell. Mol. Med.*, 2020, Vol. 24, no. 17, pp. 9945-9957.
3. Chong B., Jayabaskaran J., Jauhari S.M., Chan S.P., Goh R., Kueh M.T.W., Li H., Chin Y.H., Kong G., Anand V.V., Wang J.-W., Muthiah M., Jain V., Mehta A., Lim S.L., Foo R., Figtree G.A., Nicholls S.J., Mamas M.A., Januzzi J.L., Chew N., Richards A.M., Chan M.Y. Global burden of cardiovascular diseases: projections from 2025 to 2050. *Eur. J. Prev. Cardiol.*, 2024, *zwae281*. doi: 10.1093/eurjpc/zwae281.
4. Fan Y., Pionneau C., Cocozza F., Boëlle P., Chardonnet S., Charrin S., Théry C., Zimmermann P., Rubinstein E. Differential proteomics argues against a general role for CD9, CD81 or CD63 in the sorting of proteins into extracellular vesicles. *J Extracell Vesicles*, 2023, Vol. 12, no. 8, e12352. doi: 10.1002/jev2.12352.
5. Gao X.F., Wang Z.M., Wang F., Gu Y., Zhang J.J., Chen S.L. Exosomes in coronary artery disease. *Int. J. Biol. Sci.*, 2019, Vol. 15, no. 11, pp. 2461-2470.
6. Kalluri R., LeBleu V.S. The biology, function and biomedical applications of exosomes. *Science*, 2020, Vol. 367, no. 6478, eaau6977. doi: 10.1126/science.aau6977.
7. Kestecher B., Németh K., Ghosal S., Sayour N.V., Gergely T.G., Bodnár B.R., Försönits A., Sódar B.W., Oesterreicher J., Holnthoner W., Varga Z.V., Giricz Z., Ferdinandy P., Buzás E.I., Osteikoetxea X. Reduced circulating CD63⁺ extracellular vesicle levels associate with atherosclerosis in hypercholesterolaemic mice and humans. *Cardiovasc. Diabetol.*, 2024, Vol. 23, no. 1, 368. doi: 10.1186/s12933-024-02459-w.
8. Martins-Marques T. Connecting different heart diseases through intercellular communication. *Biol. Open*, 2021, Vol. 10, no. 9, bio058777. doi: 10.1242/bio.058777.
9. Røsand Ø., Høydal M.A. Cardiac exosomes in ischemic heart disease – a narrative review. *Diagnostics*, 2021, Vol. 11, no. 2, 269. doi: 10.3390/diagnostics11020269.
10. Saint-Pol J., Fenart L. CD63, a new therapeutical candidate for cholesterol homeostasis regulation through extracellular vesicles? *Extracell Vesicles Circ. Nucl. Acids*, 2025, Vol. 6, no. 1, pp. 166-170.
11. Schmidt S.C., Massenberg A., Homsy Y., Sons D., Lang T. Microscopic clusters feature the composition of biochemical tetraspanin-assemblies and constitute building-blocks of tetraspanin enriched domains. *Sci. Rep.*, 2024, Vol. 14, no. 1, 2093. doi: 10.1038/s41598-024-52615-1.
12. Seth S.M., Aaron W.A., Norrina B.A., Almarzooq Z.I., Anderson C.A.M., Arora P., Avery C.L., Baker-Smith C.M., Bansal N., Beaton A.Z., Commodore-Mensah Y., Currie M.E., Elkind M.S.V., Fan W., Generoso G., Gibbs B.B., Heard D.G., Hiremath S., Johansen M.C., Kazi D.S., Ko D., Leppert M.H., Magnani J.W., Michos E.D., Mussolino M.E., Parikh N.I., Perman S.M., Rezk-Hanna M., Roth G.A., Shah N.S., Springer M.V., St-Onge M.-P., Thacker E.L., Urbut S.M., Van Spall H.G.C., Voeks J.H., Whelton S.P., Wong N.D., Wong S.S., Yaffe K., Palaniappan L.P.; American Heart Association Council on Epidemiology and Prevention Statistics Committee and Stroke Statistics Committee 2025 Heart Disease and Stroke Statistics: A Report of US and Global Data From the American Heart Association. *Circulation*, Vol. 151, no. 8, pp. e41-e660.

Авторы:

Ревякина М.О. — к.м.н., доцент кафедры иммунологии и специализированных клинических дисциплин, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной, трансляционной и цифровой кардиоиммунологии ФГБОУ ВО «Орловский государственный университет имени И.С. Тургенева», г. Орел, Россия

Кабина Н.А. — научный сотрудник лаборатории новых медицинских технологий ФГБОУ ВО «Орловский государственный университет имени И.С. Тургенева», г. Орел, Россия

Authors:

Reviakina M.O., PhD (Medicine), Associate Professor of the Department of Immunology and Specialized Clinical Disciplines, Leading Researcher at the Laboratory of Molecular, Translational and Digital Cardioimmunology, I. Turgenev Orel State University, Orel, Russian Federation

Kabina N.A., Researcher, Laboratory of New Medical Technologies, I. Turgenev Orel State University, Orel, Russian Federation

Поступила 30.03.2025

Отправлена на доработку 15.04.2025

Принята к печати 25.05.2025

Received 30.03.2025

Revision received 15.04.2025

Accepted 25.05.2025

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ Wnt-5a В КАЧЕСТВЕ НОВОГО ДИАГНОСТИЧЕСКОГО БИОМАРКЕРА ПРИ ИНФАРКТЕ МИОКАРДА

Снимщикова И.А.¹, Коньшина А.В.²

¹ ФГБОУ ВО «Орловский государственный университет имени И.С. Тургенева», г. Орел, Россия

² ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр травматологии и ортопедии имени Н.Н. Приорова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Резюме. Сердечно-сосудистые заболевания продолжают оставаться ведущей причиной заболеваемости и смертности в мире, что подчеркивает необходимость инновационных подходов к их диагностике, профилактике и лечению. Одним из перспективных направлений является изучение роли фундаментального и высококонсервативного Wnt-сигнального пути. Wnt-5a является Wnt-лигандом, секретируемым различными клетками, участвующим как в процессах эмбриогенеза, так и поддержания гомеостаза и регенерации организма. Учитывая многофункциональный характер Wnt-5a с потенциально противоречивыми эффектами, требуется проведение дополнительных исследований для более глубокого понимания молекулярных механизмов его участия в патогенезе ИБС и разработке новых подходов к диагностике с использованием Wnt-5a в качестве перспективного биомаркера. Цель работы — изучение клинической значимости уровня сывороточного Wnt-5a при остром инфаркте миокарда. В исследование вошли 70 пациентов молодого и среднего возраста с острым инфарктом миокарда (I группа), госпитализированных в региональный сосудистый центр Орловской областной клинической больницы и 20 условно здоровых лиц (II контрольная группа), сопоставимых с ними по возрасту и полу. Диагностика острого инфаркта миокарда проводилась в соответствии с клиническими рекомендациями Министерства здравоохранения РФ в актуальной на момент исследования редакции. Уровень Wnt-5a и IL-6 в сыворотке крови определяли в двух повторях методом иммуноферментного анализа с использованием коммерческих наборов реагентов Sunlong Biotech Co. (Китай) и АО «Вектор-Бест» (Россия). Статистические расчеты выполнялись в онлайн версии программы StatTech. Исследования показали, что медианные значения Wnt-5a были значительно ниже в сыворотке крови пациентов с инфарктом миокарда по сравнению с условно здоровыми лицами. Максимально низкие значения Wnt-5a отмечались в 1-е сутки у пациентов с ранее перенесенным инфарктом миокарда и развившимся постинфарктным кардиосклерозом, с тенденцией к нарастанию Wnt-5a в сыворотке крови к 7-м суткам, что сочеталось с более тяжелым течением инфаркта миокарда. При типичном течении инфаркта миокарда отмечалась динамика продукции Wnt-5a со снижением его значений к 7-м суткам патологического процесса. Максимальные показатели Wnt-5a

Адрес для переписки:

Снимщикова Ирина Анатольевна
ФГБОУ ВО «Орловский государственный университет
имени И.С. Тургенева»
302026, Россия, г. Орел, ул. Комсомольская, 95.
Тел.: 8 (910) 748-29-29.
E-mail: snimshikova@mail.ru

Address for correspondence:

Irina A. Snimshchikova
I. Turgenev Orel State University
95 Komsomolskaya St
Orel
302026 Russian Federation
Phone: +7 (910) 748-29-29.
E-mail: snimshikova@mail.ru

Образец цитирования:

И.А. Снимщикова, А.В. Коньшина «Использование Wnt-5a в качестве нового диагностического биомаркера при инфаркте миокарда» // Российский иммунологический журнал, 2025. Т. 28, № 3. С. 817-822.
doi: 10.46235/1028-7221-17271-WAA

© Снимщикова И.А., Коньшина А.В., 2025
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

I.A. Snimshchikova, A.V. Konshina "Wnt-5a as a potential novel biomarker in myocardial infarction", Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2025, Vol. 28, no. 3, pp. 817-822.
doi: 10.46235/1028-7221-17271-WAA

© Snimshchikova I.A., Konshina A.V., 2025
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.46235/1028-7221-17271-WAA

регистрировались у пациентов с кальцификацией клапанов сердца и коронарных сосудов. Установлена статистически значимая обратная корреляционная зависимость Wnt-5a и IL-6 в течение воспалительного процесса при инфаркте миокарда. Полученные данные иллюстрируют потенциал Wnt5a в качестве биомаркера острого инфаркта миокарда и необходимость дальнейшего изучения его кардиопротективной роли при сердечно-сосудистой патологии для разработки новых диагностических инструментов и терапевтических стратегий.

Ключевые слова: Wnt-5a, IL-6, инфаркт миокарда, Wnt-сигнальный путь, ишемическая болезнь сердца, Wnt-лиганды

WNT-5a AS A POTENTIAL NOVEL BIOMARKER IN MYOCARDIAL INFARCTION

Snimshchikova I.A.^a, Konshina A.V.^b

^a I. Turgenev Orel State University, Orel, Russian Federation

^b N. Priorov National Medical Research Center of Traumatology and Orthopedics, Moscow, Russian Federation

Abstract. Cardiovascular diseases are the leading cause of morbidity and mortality worldwide, thus emphasizing a need for innovative approaches to their diagnostics, prevention and treatment. One of the promising areas is a fundamental role of a highly conservative Wnt signaling pathway. Wnt-5a is a Wnt ligand secreted by various cells, involved in the embryogenesis, homeostasis and body regeneration. Due to multifunctional, potentially contradictory Wnt-5a effects, additional studies are required in order to better understand the molecular mechanisms of its involvement in pathogenesis of ischemic heart disease and to develop new diagnostic approaches using Wnt-5a as a promising biomarker. The purpose of the work was to study clinical significance of serum Wnt-5a level in acute myocardial infarction. The study included 70 young and middle-aged patients with acute myocardial infarction (Group I) admitted to the Orel Regional Clinical Hospital, and 20 healthy individuals (Group II, controls) matched for age and gender. Acute myocardial infarction (AMI) was diagnosed according to the clinical guidelines of the Russian Health Ministry. The level of Wnt-5a and IL-6 in the blood serum was determined in two replicates by enzyme-linked immunosorbent assay using Sunlong Biotech Co and Vector-Best reagent kits. Statistical calculations were performed in the StatTech online program. The study has shown that the median values of Wnt-5a were significantly lower in blood serum of AMI patients compared to healthy individuals. The lowest Wnt-5a values were observed on day 1 in patients with a history of myocardial infarction and extensive postinfarction cardiosclerosis, with a tendency for Wnt-5a increase by day 7, being associated with severe course of myocardial infarction. In patients with typical myocardial infarction, a decrement of Wnt-5a values was noted by day 7 of the pathological process. The maximum Wnt-5a values were recorded in patients with calcification of heart valves and coronary vessels. We have found an inverse correlation between Wnt-5a and IL-6 associated with inflammatory process in myocardial infarction. The obtained results suggest a value of Wnt-5a as a potential biomarker of acute myocardial infarction, requiring further research on its cardioprotective role aiming at development of novel diagnostic and therapeutic strategies.

Keywords: Wnt-5a, IL-6, myocardial infarction, Wnt signaling, coronary heart disease, Wnt ligands

Работа выполнена в ОГУ имени И.С. Тургенева в рамках государственного задания № 075-00195-25-00 на 2025 год и на плановый период 2026 и 2027 годов, проект FSGN-2024-0014 (1024041900023-6-3.1.3;3.2.12;3.2.4).

Введение

Сердечно-сосудистые заболевания, в первую очередь инфаркт миокарда, продолжают оставаться ведущей причиной заболеваемости и смертности во всем мире [10, 12]. Несмотря на

значительные достижения в области технологий здравоохранения и терапевтических стратегий, число пациентов с ишемической болезнью сердца продолжает расти, что подчеркивает необходимость инновационных подходов к диагностике, профилактике и лечению [1].

Одним из перспективных направлений является изучение роли фундаментального и высококонсервативного сигнального пути Wnt, участвующего в многочисленных биологических процессах, начиная с эмбрионального развития

и заканчивая гомеостазом тканей взрослого организма [9, 11]. В настоящее время у людей известно 19 белков Wnt, которые действуют как лиганды для нескольких мембраносвязанных рецепторов [6].

Wnt-5a является членом семейства Wnt — сигнальных протеинов, секретируемых различными клетками (моноциты, лимфоциты, кардиомициты и др.) и важных для эмбриогенеза, гомеостаза, поддержания стволовых клеток, регенерации и др. Wnt-5a, активируя β -катенин-независимые неканонические пути: планарной клеточной полярности, Ca^{2+} -зависимые пути, NF- κB и др. [2], участвует в различных патологических процессах, включая атеросклероз, ишемическую болезнь сердца, метаболические нарушения [8]. Wnt-5a опосредует продукцию провоспалительных цитокинов и хемокинов, регулирует миграцию и привлечение в зону репаративной регенерации тканей различных иммунных эффекторных клеток, которые, в свою очередь, являясь источником продукции воспалительных медиаторов (IL-1, IL-6, TNF α и др.), могут регулировать экспрессию Wnt-5a и способствовать продукции Wnt-лигандов [2, 8].

В ряде экспериментальных и клинических исследований продемонстрирована выраженная экспрессия Wnt-5a в кровеносных сосудах и сыворотке крови при атеросклеротических поражениях, а также в висцеральной жировой ткани пациентов с ожирением [8].

Однако при сердечно-сосудистой патологии роль Wnt-5a не всегда однозначна, и в ряде случаев, он может проявлять аутокринно/паракринное противовоспалительное действие, как в отношении иммунорегуляторных клеток, так и синтеза супрессорных медиаторов [2, 3, 5].

Учитывая многофункциональный характер Wnt-5a с потенциально противоречивыми эффектами, требуется проведение дополнительных исследований для более глубокого понимания молекулярных механизмов его участия в патогенезе ИБС и разработке новых подходов к диагностике с использованием Wnt-5a в качестве перспективного биомаркера. В связи с этим наше исследование было сосредоточено на изучении клинической значимости уровня сывороточного Wnt-5a при остром инфаркте миокарда (ОИМ).

Материалы и методы

В проводимое исследование вошли 70 пациентов молодого и среднего возраста (от 18 до 59 лет, в соответствии с классификацией ВОЗ) с ОИМ (I группа), госпитализированных в региональный сосудистый центр БУЗ Орловской области «Орловская областная клиническая больница», и 20 условно здоровых лиц (II контрольная

группа), сопоставимых с ними по возрасту и полу. Ввиду отсутствия общепринятых референсных значений исследуемых показателей, данные, полученные у лиц контрольной группы, принимались нами за физиологическую норму.

Распределение по полу и возрасту в группах пациентов было представлено следующим образом: I группа включала в себя 25 женщин и 45 мужчин (средний возраст — $43,8 \pm 5,3$ года), II группа — 10 женщин и 10 мужчин (средний возраст — $40,9 \pm 6,2$ года). Статистических различий по возрасту и полу в исследуемых группах выявлено не было ($p > 0,05$).

Диагностика ОИМ проводилась в соответствии с клиническими рекомендациями Министерства здравоохранения РФ в актуальной на момент исследования редакции.

Исследования были одобрены этическим комитетом Орловского государственного университета имени И.С. Тургенева (Протокол № 1 от 14.10.2024) и выполнены в соответствии с руководящими принципами Хельсинкской декларации и стандартами GCP. Перед включением в исследование у всех больных получено письменное информированное согласие об использовании результатов их обследования в научных целях.

В зависимости от изменений на ЭКГ пациенты I группы распределились следующим образом: переднебоковая локализация инфаркта миокарда регистрировалась у 47,14%; переднеперегородочная — у 14,3%; нижнедиафрагмальная — у 24,3%; нижнебоковая — у 14,3% больных.

Инфаркт миокарда с подъемом сегмента ST встречался у 20 пациентов с ОИМ. Трансмуральный (Q-инфаркт миокарда) превалировал у пациентов I группы и регистрировался в 37 случаях (52,9%).

Общеклинические лабораторные исследования выполнялись с использованием анализаторов Maxm Analyzer (Великобритания) и Monarch chemistry system (Италия).

Забор венозной крови осуществлялся у пациентов утром натощак в первые 24 часа и на 7-е сутки с момента госпитализации, в дальнейшем кровь центрифугировали в течение 15 минут со скоростью 1500 оборотов/мин, сыворотку аликвотировали, замораживали при температуре — 24 °C и хранили от 1 до 2 месяцев без повторных циклов размораживания до использования.

Уровень Wnt-5a и IL-6 в сыворотке крови определяли в двух повторах методом иммуноферментного анализа (ИФА). Проведение измерений оптической плотности производилось на фотометре STAT FAX 2100 (Awareness Technology, США) с использованием коммерческих наборов реагентов Sunlong Biotech Co. (Китай, чувствительность набора 0,6 пг/мл, диапазон определя-

емых значений 30–2000 пг/мл) для Wnt-5a и АО «Вектор-Бест» (Россия, чувствительность набора 0,5 пг/мл, диапазон измерений 0–300 пг/мл) для IL-6, согласно протоколам производителей.

Статистические расчеты выполнялись в онлайн версии программы StatTech 4.5.0 (ООО «Статтех», Россия, 2024).

Результаты и обсуждение

Одной из актуальных областей исследования Wnt-сигналинга является его участие в развитии и гомеостазе сердца, что обеспечивает ключевое понимание молекулярных механизмов, управляющих формированием и функционированием сердечной мышцы [6, 9, 11]. В контексте инфаркта миокарда, когда наблюдается обширная потеря кардиомиоцитов, приводящая к нарушению функции сердца, изучение Wnt-сигналинга может стать ключом к инновационным диагностическим и терапевтическим стратегиям. После инфаркта миокарда сердечная ткань подвергается значительному ремоделированию, которое сопровождается структурными и функциональными изменениями миокарда и ассоциировано с аномальной активацией Wnt-сигнального пути [4, 7, 13].

Имеющиеся в настоящее время работы, посвященные Wnt-5a, свидетельствуют о возможности его использования как маркера сердечно-сосудистой патологии, особенно с учетом данных о выраженной экспрессии Wnt-5a сердечными миоцитами [2, 8]. Вместе с тем, в клинических и экспериментальных исследованиях в отношении дисрегуляции Wnt-5a-сигнального пути имеются противоречивые данные [2, 3, 5, 8], что обосновывает актуальность оценки вовлеченности в патофизиологический процесс при ОИМ Wnt-5a и динамики его продукции в рамках проведения биомониторинга в течение госпитального периода.

Результаты проведенных нами исследований показали, что медианные значения Wnt-5a были значительно ниже в образцах сыворотки пациентов с инфарктом миокарда по сравнению с условно здоровыми лицами ($p < 0,05$). Однако при этом можно выделить две популяции пациентов с инфарктом миокарда в отношении продукции Wnt-5a. Так, примерно у 33% больных с ОИМ в первые 24 часа с момента госпитализации уровень белка Wnt-5a был аналогичен уровню здоровых лиц, а у оставшейся популяции сывороточная концентрация Wnt-5a оказалась ниже, чем в контрольной группе (рис. 1), что в целом может быть связано как с физиологической гетерогенностью экспрессии Wnt-5a, так и изменением его секреции на фоне дисфункции кардиомиоцитов.

Следует отметить, что при анализе индивидуальных сывороточных показателей Wnt-5a у пациентов с ранее перенесенным инфарктом миокарда и развившимся постинфарктным кардиосклерозом, отмечались максимально низкие значения Wnt-5a (80 ± 10 пг/мл) в 1-е сутки с момента развития инфаркта миокарда, с тенденцией к нарастанию концентрации Wnt-5a в сыворотке крови до 130–160 пг/мл к 7-му дню госпитализации. Эта динамика сочеталась с более тяжелым течением инфаркта миокарда, что может косвенно свидетельствовать о нарушении процессов регенерации и ремоделирования тканей, в котором Wnt-5a принимает непосредственное участие. Наряду с этим, при типичном течении ОИМ отмечалось иная тенденция выработки Wnt-5a со снижением значений данных показателей к 7-м суткам патологического процесса. Однако в обоих случаях не был достигнут целевой уровень концентраций Wnt-5a, характерный для лиц контрольной группы.

Кроме того, нами не было установлено статистически значимых различий в сывороточных концентрациях Wnt-5a в зависимости от локализации инфаркта миокарда ($p > 0,05$).

Отдельного внимания заслуживают данные о максимально высоких значениях Wnt-5a (≥ 290 пг/мл), полученных у пациентов с кальцификацией клапанов сердца и коронарных сосудов по данным Эхо-КГ, что подтверждает участие неканонических лигандов Wnt-5a в сосудистой кальцификации.

Как известно, сразу после инфаркта миокарда развивается воспалительная реакция, направленная на удаление некротизированных тканей и инициацию процессов заживления, включая продукцию и высвобождение медиаторов воспаления, одним из ключевых элементов которых является IL-6. Как показали результаты нашего исследования, сывороточный уровень IL-6 резко возрастает в первые часы ОИМ (рис. 2), что согласуется с данными литературы [14]. В настоящем исследовании мы дополнительно подтвердили не только повышение IL-6 в 1-е сутки, но и отметили снижение в динамике его концентрации к 7-му дню ОИМ (рис. 2), что соответствует результатам работ о динамике сывороточной продукции IL-6 по мере смены фазы и активности воспалительного процесса [14] и дополнительно подтверждается установленными прочными отрицательными корреляционными связями Wnt-5a с показателями лейкоцитов и СОЭ общего анализа крови ($r = -0,61$; $r = -0,45$, $p < 0,05$).

Проведенный корреляционный анализ взаимосвязи Wnt-5a и IL-6 позволил установить заметной тесноты обратную связь по шкале Чеддока ($p = -0,554$; $p < 0,05$), что подтверждает тот

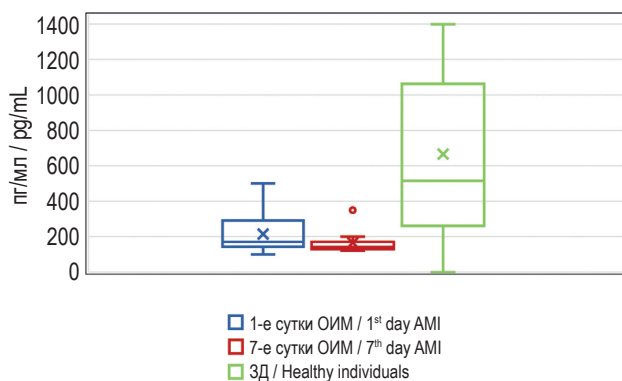


Рисунок 1. Сывороточный уровень Wnt-5a (пг/мл) у пациентов с острым инфарктом миокарда на 1-е и 7-е сутки госпитализации и здоровых лиц

Figure 1. Serum Wnt-5a level (pg/ml) in patients with acute myocardial infarction on days 1 and 7 of hospitalization and in healthy individuals

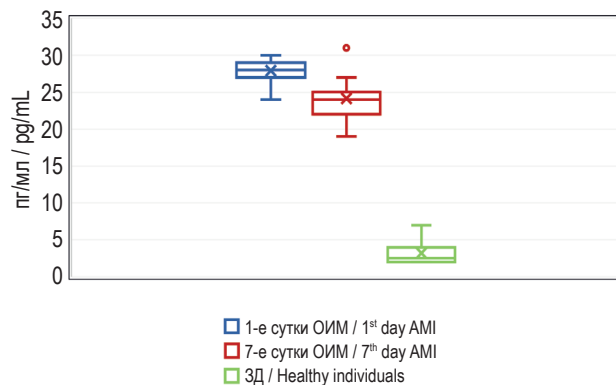


Рисунок 2. Сывороточный уровень IL-6 (пг/мл) у пациентов с острым инфарктом миокарда на 1-е и 7-е сутки госпитализации и здоровых лиц

Figure 2. Serum IL-6 level (pg/mL) in patients with acute myocardial infarction on days 1 and 7 of hospitalization and in healthy individuals

факт, что высокие концентрации IL-6 могут оказывать ингибирующее воздействие на Wnt-5a-сигнальный путь. Подавление активности Wnt-5a может временно ограничивать процессы ремоделирования, препятствуя нормальному восстановлению тканей миокарда, до наступления фазы снижения интенсивности воспаления.

При сопоставлении уровней Wnt-5a у пациентов с Q- и не-Q-инфарктом миокарда, а также с элевацией и без элевации сегмента ST электрокардиограммы, не удалось выявить статистически значимых различий ($p = 0,554$; $p = 0,591$ соответственно; используемый метод t-критерий Стьюдента).

Отдельно стоит отметить, что у пациентов с наличием патологического зубца Q — на ЭКГ

концентрация Wnt-5a была на 15–20% ниже, чем у больных с не Q — ОИМ, на фоне максимально высокого сывороточного уровня IL-6 в 1-е сутки течения Q — инфаркта миокарда.

Заключение

Таким образом, проведенные нами исследования показали вовлеченность Wnt-5a в патогенез ОИМ. Хотя это многообещающая область исследований и взаимодействия сигнального пути Wnt в рамках сложной биологии сердечно-сосудистой системы полностью не изучены, полученные нами предварительные данные позволяют открыть новые потенциальные диагностические возможности этого биомаркера.

Список литературы / References

1. Bansal A., Hiwale K. Updates in the management of coronary artery disease: a review article. *Cureus*, 2023, Vol. 15, no. 12, e50644. doi: 10.7759/cureus.50644.
2. Bhatt P.M., Malgor R. Wnt5a: a player in the pathogenesis of atherosclerosis and other inflammatory disorders. *Atherosclerosis*, 2014, Vol. 237, no. 1, pp. 155-162.
3. Chen X., Liu H.L., Li D.H., Wang J.S., Zhao F. Dual role of Wnt5a in the progression of inflammatory diseases. *Chin. Med. Sci. J.*, 2022, Vol. 37, no. 3, pp. 265-274.
4. Fu W.B., Wang W.E., Zeng C.Y. Wnt signaling pathways in myocardial infarction and the therapeutic effects of Wnt pathway inhibitors. *Acta Pharmacol. Sin.*, 2019, Vol. 40, no. 1, pp. 9-12.
5. Halleskog C., Schulte G. WNT-3A and WNT-5A counteract lipopolysaccharide-induced pro-inflammatory changes in mouse primary microglia. *J. Neurochem.*, 2013, Vol. 125, no. 6, pp. 803-808.
6. Hayat R., Manzoor M., Hussain A. Wnt signaling pathway: A comprehensive review. *Cell Biol. Int.*, 2022, Vol. 46, no. 6, pp. 863-877.
7. Horitani K., Shiojima I. Wnt signaling in cardiac development and heart diseases. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.*, 2024, Vol. 60, no. 5, pp. 482-488.
8. Huang Y., Xue Q., Chang J., Wang X., Miao C. Wnt5a: A promising therapeutic target for inflammation, especially rheumatoid arthritis. *Cytokine*, 2023, Vol. 172, 156381. doi: 10.1016/j.cyto.2023.156381.
9. Li D., Sun J., Zhong T.P. Wnt signaling in heart development and regeneration. *Curr. Cardiol. Rep.*, 2022, Vol. 24, no. 10, pp. 1425-1438.

10. Nedkoff L., Briffa T., Zemedikun D., Herrington S., Wright F.L. Global trends in atherosclerotic cardiovascular disease. *Clin. Ther.*, 2023, Vol. 45, no. 11, pp. 1087-1091.
11. Rim E.Y., Clevers H., Nusse R. The Wnt Pathway: from signaling mechanisms to synthetic modulators. *Annu. Rev. Biochem.*, 2022, Vol. 91, pp. 571-598.
12. Roth G.A., Mensah G.A., Johnson C.O., Addolorato G., Ammirati E., Baddour L.M., Barengo N.C., Beaton A.Z., Benjamin E.J., Benziger C.P., Bonny A., Brauer M., Brodmann M., Cahill T.J., Carapetis J., Catapano A.L., Chugh S.S., Cooper L.T., Coresh J., Criqui M., DeCleene N., Eagle K.A., Emmons-Bell S., Feigin V.L., Fernández-Solà J., Fowkes G., Gakidou E., Grundy S.M., He F.J., Howard G., Hu F., Inker L., Karthikeyan G., Kassebaum N., Koroshetz W., Lavie C., Lloyd-Jones D., Lu H.S., Mirijello A., Temesgen A.M., Mokdad A., Moran A.E., Muntner P., Narula J., Neal B., Ntsekhe M., de Oliveira G.M., Otto C., Owolabi M., Pratt M., Rajagopalan S., Reitsma M., Ribeiro A.L.P., Rigotti N., Rodgers A., Sable C., Shakil S., Sliwa-Hahnle K., Stark B., Sundström J., Timpel P., Tleyjeh I.M., Valgimigli M., Vos T., Whelton P.K., Yacoub M., Zuhlke L., Murray C., Fuster V.; GBD-NHLBI-JACC Global Burden of Cardiovascular Diseases Writing Group Global burden of cardiovascular diseases and risk factors, 1990–2019: update from the GBD 2019 study. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 2020, Vol. 76, pp. 2982-3021.
13. Snimshchikova I.A., Plotnikova M.O. Role of morphogenic proteins of the WNT signaling pathway in coronary artery disease. *Medical Immunology (Russia)*, 2023, Vol. 25, no. 4, pp. 985-990. doi: 10.15789/1563-0625-ROM-2835.
14. Tanaka T., Narazaki M., Kishimoto T. IL-6 in inflammation, immunity, and disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, 2014, Vol. 6, no. 10, a016295. doi: 10.1101/cshperspect.a016295.
15. van Dijk E.M., Menzen M.H., Spanjer A.I., Middag L.D., Brandsma C.A., Gosens R. Noncanonical WNT-5B signaling induces inflammatory responses in human lung fibroblasts. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, 2016, Vol. 310, no. 11, pp. L1166-L1176.

Авторы:

Снимщикова И.А. — д.м.н., профессор, заведующая кафедрой иммунологии и специализированных клинических дисциплин, директор Медицинского института, ведущий научный сотрудник лаборатории новых медицинских технологий ФГБОУ ВО «Орловский государственный университет имени И.С. Тургенева», г. Орел, Россия

Коньшина А.В. — к.б.н., доцент кафедры травматологии, ортопедии и смежных дисциплин, начальник управления по образовательной деятельности ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр травматологии и ортопедии имени Н.Н. Приорова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Authors:

Snimshchikova I.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Head of the Department of Immunology and specialized clinical disciplines, Director of Medical Institute, Leading Researcher at the Laboratory of New Medical Technologies, I. Turgenev Orel State University, Orel, Russian Federation

Konshina A.V., PhD (Biology), Associate Professor of the Department of Traumatology, Orthopedics and Related Disciplines, Head of the Department of Educational Activities, N. Priorov National Medical Research Center of Traumatology and Orthopedics, Moscow, Russian Federation

Поступила 07.05.2025
Принята к печати 25.05.2025

Received 07.05.2025
Accepted 25.05.2025

СКРИНИНГОВАЯ ОЦЕНКА ИММУННОГО СТАТУСА ПАЦИЕНТОВ С ОСТРЫМ КОРОНАРНЫМ СИНДРОМОМ

Сафронова Э.А.^{1,2}, Рябова Л.В.¹, Сарапульцев Г.П.³

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

² 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

³ ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук, г. Екатеринбург, Россия

Резюме. Целью работы было определение различий в клинической картине и иммунологическом статусе у больных с острым коронарным синдромом и постковидным синдромом (ПКС) с учетом уровня TREC в периферической крови. Обследовано 32 пациента в возрасте от 40 до 65 лет с ОКС и перенесенным ранее COVID-19 от 6 до 18 месяцев. Всем пациентам выполнялась коронароангиография и проводилось стентирование коронарных артерий. Для определения уровней TREC в периферической крови использовали набор реагентов TREC/KREC-AMP PS (ФБУН НИИ Пастера, Санкт-Петербург). Для определения изучаемых субпопуляций лимфоцитов периферической крови использовали реактивы компании Beckman Coulter (США) – TetraChrome. Анализ образцов исследовали на проточном цитофлуориметре Navios™ (Beckman Coulter, США). Из числа пациентов с ОКС и ПКС содержание TREC определено 32 больным, из них с нестабильной стенокардией было 28 лиц, а с острым инфарктом миокарда без подъема сегмента ST – 3. Пациентов разделили на группы в зависимости от содержания TREC: с пониженным уровнем TREC (1-я группа) и нормальным (2-я группа). Что касается KREC, то следует отметить, что только у одного больного из исследуемых был снижен показатель, у остальных в пределах нормы, поэтому в нашей работе у лиц с ОКС и ПКС мы не нашли влияние KREC на их клинические и иммунологические особенности. Лиц со сниженными TREC регистрировалось меньшее относительное и абсолютное число Т-хелперов ($p < 0,01$), был ниже иммунорегуляторный индекс ($p < 0,01$). В то же время отмечалось в этой группе пациентов увеличение относительного ($p < 0,01$) и абсолютного числа Т-цитотоксических клеток ($p < 0,05$), а также процентного содержания Т-НК-лимфоцитов ($p < 0,05$). Также у больных 1-й группы имелась тенденция к повышению НК-лимфоцитов и снижению В-лимфоцитов (CD3⁺CD19⁺). У пациентов с ОКС и ПКС со сниженными TREC наблюдалась более тяжелая клиническая картина, но учитывая, что выборка пока не очень значительная, планируется дальнейшее исследование таких больных и при большем наборе пациентов возможно добавятся достоверности тех изменений к которым выявлена

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, Л.В. Рябова, Г.П. Сарапульцев
«Скрининговая оценка иммунного статуса пациентов
с острым коронарным синдромом» // Российский
иммунологический журнал, 2025. Т. 28, № 3. С. 823–828.
doi: 10.46235/1028-7221-17174-SOI

© Сафронова Э.А. и соавт., 2025

Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

E.A. Safronova, L.V. Ryabova, G.P. Sarapultsev “Screening
of immune status in patients with acute coronary syndrome”,
Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii
Zhurnal, 2025, Vol. 28, no. 3, pp. 823–828.
doi: 10.46235/1028-7221-17174-SOI

© Safronova E.A. et al., 2025

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

DOI: 10.46235/1028-7221-17174-SOI

пока тенденция. Выявление нарушений при помощи предложенных скрининговых методов требует формирования подходов для иммунокоррекции таких нарушений, которые в настоящее время в кардиологии только обсуждаются.

Ключевые слова: TREC, KREC, COVID-19, острый коронарный синдром, лимфоциты, иммунная система, стентирование коронарных артерий

SCREENING OF IMMUNE STATUS IN PATIENTS WITH ACUTE CORONARY SYNDROME

Safronova E.A.^{a,b}, Ryabova L.V.^a, Sarapultsev G.P.^c

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

^b University of Innovation and Continuing Education, Burnazyan Federal Medical Biophysical Center, Federal Medical-Biological Agency, Moscow, Russian Federation

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

Abstract. The aim of the work was to assess differences in clinical pattern and immunological status in patients with acute coronary syndrome (ACS) and Post-COVID syndrome (PCS), taking into account the level of TREC in the peripheral blood. A total of 32 patients aged 40 to 65 years with ACS and a history of COVID-19 from 6 to 18 months were examined. All patients underwent coronary angiography and stenting of the coronary arteries. To determine TREC levels in peripheral blood, the TREC/KREC-AMP PS reagent kit (Pasteur Research Institute, St. Petersburg) was used. To determine the studied subpopulations of peripheral blood lymphocytes, Beckman Coulter (USA) reagents — TetraChrome were used. The analysis of samples was studied with a Navios™ flow cytometer (Beckman Coulter, USA). Among patients with ACS and PCS, the TREC content was determined in 32 patients, including 28 with unstable angina and 3 with acute myocardial infarction without ST segment elevation. The patients were divided into groups depending on the TREC content: (1) with a reduced TREC level (1st group) and with normal index values (2nd group). One should note that only one patient from this group had reduced KREC values, the rest being within normal range. Therefore, we did not find any effect of KREC on clinical and immunological features of subjects with ACS and PCS. Individuals with reduced TREC levels had a lower relative and absolute number of T-helper cells ($p < 0.01$), and their immunoregulatory index was lower ($p < 0.01$). At the same time, an increase in relative ($p < 0.01$) and absolute numbers of T cytotoxic cells ($p < 0.05$), as well as percentage of T-NK lymphocytes ($p < 0.05$) was noted in this group of patients. Also, in patients from the 1st group, we have seen a tendency to increase in NK lymphocyte numbers and decrease in B lymphocytes (CD3⁺CD19⁺). A low-TREC subgroup of patients with ACS and PCS showed a more severe clinical course. However, due to limited group of patients, further study of such relations is planned with a larger set of clinical cases. Detection of immune disorders using the mentioned screening methods requires novel approaches to immunocorrection of these disorders which are currently discussed by cardiologists.

Keywords: TREC, KREC, COVID-19, acute coronary syndrome, lymphocytes, immune system, coronary artery stenting

Работа выполнена по теме гос. заданий ИИФ УрО РАН «Имунофизиологические и патофизиологические механизмы регуляции и коррекции функций организма» (№ гос. регистрации 122020900136-4), НИИВИ «ВИРОМ» «Изучение механизмов формирования хронической вирусной инфекции у пациентов с постковидным синдромом и нарушением функций иммунной системы. Разработка патогенетических подходов к эффективной профилактике и иммунокоррекции выявленных нарушений у пациентов с «постковидным синдромом» (№ гос. регистрации 124031500020-4).

Введение

При постковидном синдроме, в том числе и у больных с острым коронарным синдромом (ОКС) выявлены различные нарушения Т- и В-звена иммунитета и НК-клеток [7]. Исследование полноценного иммунного статуса очень дорогостоящи и поэтому мы начали поиск вариантов оценки скрининговыми методами, к которым относятся молекулы кольцевой ДНК Т-рецепторных эксцизионных колец (TREC), каппа-делеционных рекомбинационных эксцизионных колец (KREC) и исследования с использованием тетр (CD45⁺, CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ и CD45⁺, CD16-CD56⁺, CD19⁺),

которые позволяют определять основные субпопуляции Т-, В- и НК-лейкоцитов, как наиболее часто встречающиеся нарушения при посковиде [1]. В настоящей ситуации повышается число взрослых лиц с различными иммунодефицитами, в том числе первичными. В работе М.А. Сайтгалиной и соавт. [4] найдена статистически значимая разница в содержании TREC в группах разных возрастов. При ВИЧ-инфекции наблюдалось значимое падение достоверное снижение уровней TREC и KREC при длительном течении ВИЧ-инфекции [3].

В работе М.А. Сайтгалиной и соавт. [5] показано, что молекулярными маркерами степени выраженности Т- и В-лимфопений может быть содержание в периферической TREC и KREC. TREC и KREC можно считать количественным маркером недифференцированных Т- и В-клеток в центральных лимфоидных органах и Т- и В-лимфоцитов на периферии. У 63,7% скончавшихся от COVID-19 больных содержание молекул TREC/KREC было ниже возрастных норм. TREC и CD-3,4 снижались у части пациентов с постковидным синдромом (ПКС) [1]. Также в исследовании А.В. Зурочки и соавт. показана дисфункция иммунной защиты в Т-клеточном звене больных с ПКС, что возможно обусловлено нарушением образования Т-клеток в вилочковой железе. Длительное снижение уровня TREC в крови воздействует на иммунитет пациентов и требует иммунокорректирующего лечения. В то же время у лиц с ОКС и ПКС это не исследовалось прежде, поэтому актуальным было изучить у пациентов ОКС TREC и KREC и тетр (CD45⁺, CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ и CD45⁺, CD16-CD56⁺, CD19⁺).

Целью работы было определение различий в клинической картине и иммунологическом статусе у больных с ОКС и ПКС с учетом уровня TREC в периферической крови.

Материалы и методы

Обследовано 32 пациента в возрасте от 40 до 65 лет с ОКС и болевшими прежде COVID-19 от 6 до 18 месяцев назад. Всем пациентам выполнялась коронароангиография и проводилось стентирование коронарных артерий. Также определяли общепринятые лабораторные показатели, инструментальное обследование, в том числе электрокардиографию, доплер-эхокардиографию.

Для определения уровней TREC в периферической крови определяли численную мультиплексную ПЦР параллельно с амплификацией целевого фрагмента ДНК TREC и фрагментов двух нормировочных генов HPRT и RPP30, применяя набор реагентов TREC/KREC-AMP PS (ФБУН НИИ Пастера, Санкт-Петербург) [6]. Те данные, которые были получены, сопоставляли с

нормальными значениями в зависимости от возраста [4].

При регистрации исследуемых субпопуляций лимфоцитов крови применяли реактивы компании Beckman Coulter (США) — TetraChrome. При определении Т-лимфоцитов (фенотип CD3⁺CD19⁻), В-лимфоцитов (фенотип CD3⁻CD19⁺), НК-клеток (фенотип CD3⁻CD56⁺CD16⁺) и Т-НК-лимфоцитов (фенотип CD3⁺CD56⁺CD16⁺) использовали моноклональные антитела: CD45-FITC, CD56-RD1+CD16-PE, CD19-ECD и CD3-PC5. При регистрации Т-хелперов CD3⁺CD4⁺ и цитотоксических Т-лимфоцитов CD3⁺CD8⁺ применяли антитела CD45-FITC, CD4-RD1, CD8-ECD и CD3-PC5. Анализ образцов исследовали на проточном цитофлуориметре Navios™ (Beckman Coulter, США) [8].

Результаты и обсуждение

Из числа пациентов с ОКС и ПКС содержание TREC определено 32 больным, из них с нестабильной стенокардией было 28 лиц, а с острым инфарктом миокарда без подъема сегмента ST (ОИМ бпST) — 3. Пациентов разделили на группы в зависимости от содержания TREC: с пониженным уровнем TREC (1-я группа) и нормальным (2-я группа). Что касается KREC, то следует отметить, что только у одного больного из исследуемых был снижен показатель, у остальных в пределах нормы, поэтому в нашей работе у лиц с ОКС и ПКС мы не обнаружили влияния KREC на их клинические и иммунологические особенности.

При сопоставлении лиц с ОКС и ПКС в зависимости от содержания TREC, необходимо зафиксировать, что была достоверная разница в содержании этого параметра между сравниваемыми группами ($p < 0,05$) (табл. 1).

Были проанализированы клинические, лабораторные и инструментальные показатели у пациентов со сниженным количеством TREC (1-я группа) и нормальным содержанием TREC (2-я группа).

Пациенты обеих групп не отличались по возрасту, давности перенесенного COVID-19, продолжительности госпитализации. Что касается поражения легочной ткани при COVID-19, то в 1-й группе КТ-1 (до 25%) было выше, чем у лиц 2-й группы: 37,5% пациентов и 20,83% соответственно. Также было меньше отсутствие КТ-признаков ковидной пневмонии: у лиц с пониженными TREC 50%, в то время как у больных с повышенными TREC — 66,67%. Регистрировалось достоверное увеличение риска по Грейс ($p < 0,05$) у лиц с низкими TREC. В настоящую госпитализацию обращает на себя внимание больший процент установления 2 стентов у боль-

ТАБЛИЦА 1. КЛИНИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПАЦИЕНТОВ С ОКС И ПОСТКОВИДНЫМ СИНДРОМОМ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СОДЕРЖАНИЯ TREC

TABLE 1. CLINICAL CHARACTERISTICS OF PATIENTS WITH ACS AND POST-COVID SYNDROME DEPENDING ON THE CONTENT OF TREC

Показатель Indicator	TREC пониженные TREC decreased (n = 8)	TREC нормальные TREC normal (n = 24)	T	p
TREC	5,23±2,17	196,26±46,44	2,35	0,013
Поражение легочной ткани по компьютерной томографии (КТ), % Lung tissue damage according to computed tomography (CT), %				
Не было поражения (0%) There was no defeat (0%)	4 (50,00%)	16 (66,67%)		
КТ-1 (до 25%) CT-1 (up to 25%)	3 (37,50%)	5 (20,83%)		
Риск по Грейс, баллы Risk by Grace, points	107,63±6,90	92,58±5,17	1,53	0,049
Количество установленных стентов в настоящую госпитализацию Number of stents installed during current hospitalization				
0	4 (50%)	10 (41,67%)		
1	1 (12,5%)	9 (37,5%)		
2	2 (25%)	4 (16,67%)		
3	0	1 (4,17%)		
4	1 (12,5%)	0		
Фракция выброса (Симпсон), % Ejection fraction (Simpson), %				
Сохранная (более 50%) Preserved (more than 50%)	3 (37,5%)	15 (62,5%)		
Промежуточная (40-49%) Intermediate (40-49%)	3 (37,5%)	6 (25%)		
Низкая (менее 40%) Low (less than 40%)	2 (25%)	3 (12,5%)		

ных с низкими TREC: 25% против 16,67% соответственно. У одного пациента из 1-й группы было имплантировано 4 стента в отличие от лиц с нормальными TREC. Сохранная ФВ преобладала у больных 2-й группы, промежуточная и низкая ФВ преобладали у пациентов пониженными TREC (37,5 и 25% соответственно). Имелась тенденция к увеличению тропонина у больных 1-й группы. ОИМ на момент настоящей госпитализации был у 1 больного среди лиц с низкими TREC (12,5%) и у 2 пациентов с нормальными TREC (8,33%). Таким образом, согласно полученным данным, более тяжелая в клиническом плане была когорта пациентов с пониженными TREC.

В таблице 2 представлены сравнительные особенности иммунных показателей в зависимости от содержания TREC.

У лиц со сниженными TREC регистрировалось меньшее относительное и абсолютное

число Т-хелперов ($p < 0,01$), был ниже иммунорегуляторный индекс ($p < 0,01$). В то же время отмечалось в этой группе пациентов увеличение относительного ($p < 0,01$) и абсолютного числа Т-цитотоксических клеток ($p < 0,05$), а также процентного содержания Т-НК-лимфоцитов ($p < 0,05$). Также у больных 1-й группы имелась тенденция к повышению НК-лимфоцитов и снижению В-лимфоцитов (CD3-CD19⁺).

Предложенная система оценки позволяет выявить нарушения иммунной системы у больных с ОКС (пациенты с ПКС и ОКС с низкими TREC). Учитывая что выборка пока не очень значительная, планируется дальнейшее исследование таких больных и при большем наборе пациентов возможно добавятся достоверности тех изменений к которым выявлена пока тенденция. То есть предложенная система скрининга работает и может быть предложена для широкого применения. Выявление нарушений при помощи предложенных

ТАБЛИЦА 2. СОПОСТАВЛЕНИЕ Т- И В-КЛЕТОЧНОГО ЗВЕНА ИММУНИТЕТА И НК-КЛЕТОК У ПАЦИЕНТОВ С ОКС И ПОСТКОВИДНЫМ СИНДРОМОМ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ЧИСЛА TREC

TABLE 2. COMPARISON OF T AND B CELL IMMUNITY AND NK CELLS IN PATIENTS WITH ACS AND POST-COVID SYNDROME DEPENDING ON THE NUMBER OF TREC

Показатель Indicator	TREC понижены TREC decreased (n = 8)	TREC нормальные TREC normal (n = 24)
TREC	3,83±1,85 $p_{1-2} < 0,018$	194,99±46,65
Т-хелперы (CD45⁺CD3⁺CD4⁺), % T helpers (CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD4 ⁺), %	32,78±4,17 $p_{1-2} < 0,003$	45,62±2,04
Т-хелперы (CD45⁺CD3⁺CD4⁺), 10⁶ кл/л T helpers (CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD4 ⁺), 10 ⁶ cells/L	495,28±56,69 $p_{1-2} < 0,006$	828,92±65,59
Т-цитотоксические (CD45⁺CD3⁺CD8⁺), % T cytotoxic (CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD8 ⁺), %	38,83±3,83 $p_{1-2} < 0,003$	27,27±1,76
Т-цитотоксические (CD45⁺CD3⁺CD8⁺), 10⁶ кл/л T cytotoxic (CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD8 ⁺), 10 ⁶ cells/L	635,86±113,51 $p_{1-2} < 0,043$	479,79±34,86
Иммунорегуляторный индекс (Тх/Тс) Immunoregulatory index (Тх/Тс)	0,93±0,26 $p_{1-2} < 0,004$	1,87±0,16
Т-НК-лимфоциты (CD45⁺CD3⁺CD16⁺CD56⁺), % T-NK lymphocytes (CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺), %	6,48±1,32 $p_{1-2} < 0,05$	4,33±0,59

скрининговых методов требует формирования подходов для иммунокоррекции таких нарушений, которые в настоящее время в кардиологии только обсуждаются [9].

Выводы

1. У пациентов с ОКС и ПКС со сниженными TREC наблюдалась более тяжелая клиническая картина, но учитывая, что выборка пока

не очень значительная, планируется дальнейшее исследование таких больных и при большем наборе пациентов возможно добавятся достоверности тех изменений, к которым выявлена пока тенденция.

2. Выявление нарушений при помощи предложенных скрининговых методов требует формирования подходов для иммунокоррекции таких нарушений, которые в настоящее время в кардиологии только обсуждаются.

Список литературы / References

1. Зурочка А.В., Добрынина М.А., Сафронова Э.А., Зурочка В.А., Зуйкова А.А., Сарапульцев Г.П., Забков О.И., Мосунов А.А., Верховская М.Д., Дукардт В.В., Фомина Л.О., Костоломова Е.Г., Останкова Ю.В., Кудрявцев И.В., Тотолян А.А. Нарушения Т-клеточного звена иммунитета через 6-12 месяцев после острой фазы коронавирусной инфекции: скрининговое исследование // Инфекция и иммунитет, 2024. Т. 14, № 4. С. 756-768. [Zurochka A.V., Dobrynina M.A., Safronova E.A., Zurochka V.A., Zuykova A.A., Sarapultsev G.P., Zabkov O.I., Mosunov A.A., Verkhovskaya M.D., Dukardt V.V., Fomina L.O., Kostolomova E.G., Ostankova Yu.V., Kudryavtsev I.V., Totolyan A.A. Disturbances in the T-cell component of immunity 6-12 months after the acute phase of coronavirus infection: a screening study. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2024, Vol. 14, no. 4, pp. 756-768. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-AIT-17646.
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 UB RAS, 2018. 720 p.
3. Останкова Ю.В., Сайтгалина М.А., Арсентьева Н.А., Тотолян А.А. Оценка уровней TREC/KREC у ВИЧ-инфицированных лиц // ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии, 2024. Т. 16, № 2. С. 51-59. [Ostankova Yu.V., Saitgalina M.A., Arsentieva N.A., Totolian A.A. Evaluation of TREC/KREC levels in HIV-infected individuals. *VICH-infektsiya i immunosupressii = HIV Infection and Immunosuppressive Disorders*, 2024, Vol. 16, no. 2, pp. 51-59. (In Russ.)]

4. Сайтгалина М.А., Любимова Н.Е., Останкова Ю.В., Кузнецова Р.Н., Тотолян А.А. Определение референтных интервалов циркулирующих в крови эксцизионных колец TREC и KREC у лиц старше 18 лет // Медицинская иммунология, 2022. Т. 24, № 6. С. 1227-1236. [Saytgalina M.A., Lyubimova N.E., Ostankova Yu.V., Kuznetsova R.N., To-tolian A.A. Determination of reference intervals of circulating TREC and KREC excision rings in individuals over 18 years of age. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2022, Vol. 24, no. 6, pp. 1227-1236. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-DOR-2587.
5. Сайтгалина М.А., Останкова Ю.В., Арсентьева Н.А., Коробова З.Р., Любимова Н.Е., Кащенко В.А., Куликов А.Н., Певцов Д.Э., Станевич О.В., Черных Е.И., Тотолян А.А. Значимость определения уровней молекул TREC и KREC в периферической крови для прогноза исхода заболевания COVID-19 в острый период // Российский иммунологический журнал, 2023. Т. 26, № 4. С. 611-618. [Saytgalina M.A., Ostankova Yu.V., Arsenyeva N.A., Korobova Z.R., Lyubimova N.E., Kashchenko V.A., Kulikov A.N., Pevtsov D.E., Stanevich O.V., Chernykh E.I., Totolyan A.A. The significance of determining the levels of TREC and KREC molecules in peripheral blood for predicting the outcome of COVID-19 disease in the acute period. *Rossiyskiy immunologicheskii zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2023, Vol. 26, no. 4, pp. 611-618. (In Russ.)] doi: 10.46235/1028-7221-14714-LOT.
6. Сайтгалина М.А., Останкова Ю.В., Любимова Н.Е., Семенов А.В., Кузнецова Р.Н., Тотолян А.А. Модифицированный метод количественного определения уровней TREC и KREC в периферической крови у больных с иммунодефицитными состояниями // Инфекция и иммунитет, 2022. Т. 12, № 5. С. 981-996. [Saytgalina M.A., Ostankova Yu.V., Lyubimova N.E., Semenov A.V., Kuznetsova R.N., Totolyan A.A. Modified method for quantitative determination of TREC and KREC levels in peripheral blood in patients with immunodeficiency states. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2022, Vol. 12, no. 5, pp. 981-996. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-MMF-2039.
7. Сафронова Э.А., Рябова Л.В. Особенности Т-клеточного звена иммунитета у больных с острым коронарным синдромом, болевших и не болевших COVID-19, в зависимости от содержания натуральных киллеров // Российский иммунологический журнал, 2023. Т. 26, № 3. С. 389-396. [Safronova E.A., Ryabova L.V. Features of the T-cell link of immunity in patients with acute coronary syndrome, who had and did not have COVID-19, depending on the content of natural killers. *Rossiyskiy immunologicheskii zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2023, Vol. 26, no. 3, pp. 389-396. (In Russ.)] doi: 10.46235/1028-7221-9640-FOT.
8. Хайдуков С.В., Байдун Л.А., Зурочка А.В., Тотолян А.А. Стандартизованная технология «Исследование субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови с применением проточных цитофлуориметров-анализаторов» // Российский иммунологический журнал, 2014. Т. 8 (17), № 4. С. 974-992. [Khaidukov S.V., Baidun L.A., Zurochka A.V., Totolyan A.A. Standardized technology "Study of the subpopulation composition of peripheral blood lymphocytes using flow cytofluorimeter analyzers". *Rossiyskiy immunologicheskii zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2014, Vol. 8 (17), no. 4, pp. 974-992. (In Russ.)]
9. Greca E., Kacimi O., Poudel S., Wireko A.A., Abdul-Rahman T., Michel G., Marzban S., Michel J. Immunomodulatory effect of different statin regimens on regulatory T-cells in patients with acute coronary syndrome: a systematic review and network meta-analysis of randomized clinical trials. *Eur. Heart J. Cardiovasc. Pharmacother.*, 2023, Vol. 9, no. 2, pp. 122-128.

Авторы:

Сафронова Э.А. — к.м.н., доцент, доцент кафедры поликлинической терапии и клинической фармакологии ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства Здравоохранения РФ, г. Челябинск; преподаватель 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

Рябова Л.В. — д.м.н., доцент, профессор кафедры безопасности жизнедеятельности, медицины катастроф, скорой и неотложной медицинской помощи ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Челябинск, Россия

Сарапулцев Г.П. — очный аспирант ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук, г. Екатеринбург, Россия

Authors:

Safronova E.A., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Polyclinic Therapy and Clinical Pharmacology, South Ural State Medical University, Chelyabinsk; Lecturer, Department of Therapy, University of Innovation and Continuing Education, Burnazyan Federal Medical Biophysical Center, Federal Medical-Biological Agency, Moscow, Russian Federation

Ryabova L.V., PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Professor, Department of Life Safety, Disaster Medicine, Emergency Medicine, South-Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

Sarapultsev G.P., Postgraduate Student, Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, Russian Federation

Поступила 29.03.2025

Отправлена на доработку 20.05.2025

Принята к печати 25.05.2025

Received 29.03.2025

Revision received 20.05.2025

Accepted 25.05.2025

ПОКАЗАТЕЛИ КЛЕТОЧНОГО ИММУНИТЕТА ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПОЖИЛЫХ ПАЦИЕНТОВ ПРИ МАЛЬНУТРИЦИИ

Плехова Н.Г.¹, Кабалык М.А.², Цветов Н.В.¹, Гороховская П.В.²,
Иванюк М.М.², Просекова Е.В.¹, Бельды Е.С.¹, Дондокова О.Э.¹,
Сабыныч В.А.¹

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

² КГБУЗ «Госпиталь для ветеранов войн», г. Владивосток, Россия

Резюме. Сложный динамический процесс иммуностарения характеризуется значительными изменениями компонентов и функций врожденной и приобретенной защиты организма при непрерывном истощении иммунных клеток. Несбалансированное состояние, возникающее в результате недостаточного потребления питательных веществ, мальнотриция, оказывает влияние на патогенез хронических заболеваний. Цель исследования — определение субпопуляций CD4⁺ и CD8⁺Т-лимфоцитов, В-клеток, наивных и клеток памяти при мальнотриции. Общее количество лимфоцитов, цитотоксических, Т-хелперов, процент CD45RA⁺ наивных и CD45RO⁺ клеток памяти, нейтрофилов и моноцитов были определены в периферической крови здоровых лиц менее (20 человек) и более 60 лет (22 человека) и у пациентов с умеренной (22 человека) и тяжелой степенью мальнотриции (20 человек). Установлены положительная корреляция для пациентов с мальнотрицией между показателями стандартных шкал и биоимпедансного анализа, а именно безжировой ($r = 0,654$, $p < 0,001$), активной клеточной ($r = 0,875$, $p < 0,001$) и мышечной массами ($r = 0,679$, $p < 0,001$). У пожилых лиц отмечалось достоверное повышение процента от общего числа CD3⁺ клеток цитотоксических Т-лимфоцитов, нейтрофилов и, напротив, снижение количества В-лимфоцитов и NK-клеток ($p < 0,05$). Также снижалось количество наивных клеток (CD45RA) и повышалось число клеток памяти (CD45RO). Установлена отрицательная корреляция между наличием мальнотриции у пациентов и количеством CD45RA⁺ от CD3⁺ клеток и их CD4⁺ субпопуляции ($r_{CD3^+} = -0,692$, $r_{CD4^+} = -0,595$) и, напротив, положительная с показателями CD45RO⁺Т-лимфоцитов ($r_{CD3^+} = 0,714$, $r_{CD4^+} = 0,718$ соответственно). При нарастании степени выраженности мальнотриции достоверно снижался показатель соотношения нейтрофилов к лимфоцитам ($p < 0,05$). У пожилых людей по сравнению с молодыми установлено повышение числа нейтрофилов, цитотоксических Т-лимфоцитов и, напротив, снижение количества В-лимфоцитов и NK-клеток ($p < 0,05$). У пожилых пациентов с мальнотрицией по сравнению с моло-

Адрес для переписки:

Плехова Наталья Геннадьевна
ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный
медицинский университет» Министерства
здравоохранения РФ
690002, Россия, г. Владивосток, пр. Острякова, 2.
Тел.: 8 (914) 672-69-53.
E-mail: pl_nat@hotmail.com

Address for correspondence:

Natalia G. Plekhova
Pacific State Medical University
2 Ostryakov Ave
Vladivostok
690002 Russian Federation
Phone: +7 (914) 672-69-53.
E-mail: pl_nat@hotmail.com

Образец цитирования:

Н.Г. Плехова, М.А. Кабалык, Н.В. Цветов,
П.В. Гороховская, М.М. Иванюк, Е.В. Просекова,
Е.С. Бельды, О.Э. Дондокова, В.А. Сабыныч
«Показатели клеточного иммунитета периферической
крови пожилых пациентов при мальнотриции»
// Российский иммунологический журнал, 2025. Т. 28,
№ 3. С. 829–836.
doi: 10.46235/1028-7221-17138-IOT

© Плехова Н.Г. и соавт., 2025
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

N.G. Plekhova, M.A. Kabalyk, N.V. Tsvetov,
P.V. Gorokhovskaya, M.M. Ivanyuk, E.V. Prosekova,
E.S. Beldy, O.E. Dondokova, V.A. Sabynych "Indices of
the peripheral blood cellular immunity elderly in the patients
with malnutrition", Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy
Immunologicheskii Zhurnal, 2025, Vol. 28, no. 3, pp. 829–836.
doi: 10.46235/1028-7221-17138-IOT

© Plekhova N.G. et al., 2025
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.46235/1028-7221-17138-IOT

дыми людьми снижаются показатели числа наивных лимфоцитов и CD8⁺T-клеток памяти, а количество CD4⁺T-клеток памяти значительно повышается. Показатель системного воспаления у пожилых пациентов коррелирует со степенью выраженности мальнотриции.

Ключевые слова: иммуностарение, инфламейджинг, мальнотриция, лимфоциты, наивные клетки, клетки памяти

INDICES OF THE PERIPHERAL BLOOD CELLULAR IMMUNITY ELDERLY IN THE PATIENTS WITH MALNUTRITION

Plekhoa N.G.^a, Kabalyk M.A.^b, Tsvetov N.V.^a, Gorokhovskaya P.V.^b, Ivanyuk M.M.^b, Proseko E.V.^a, Beldy E.S.^a, Dondokova O.E.^a, Sabynych V.A.^a

^a Pacific State Medical University, Vladivostok, Russian Federation

^b Hospital for War Veterans, Vladivostok, Russian Federation

Abstract. The complex dynamic process of immunosenescence is characterized by significant changes in compartments and functions of both innate and acquired defense of the organism associated with continuous depletion of immune cells. The imbalance resulting from insufficient nutrient intake, malnutrition, affects the pathogenesis of chronic diseases. The aim of the study: to determine the subpopulations of CD4⁺ and CD8⁺T lymphocytes, B cells, naive and memory cells in malnutrition. Total number of lymphocytes, cytotoxic and T helper subsets, percentage of CD45RA⁺ naive and CD45RO⁺ memory cells, neutrophils and monocytes were determined in peripheral blood of healthy individuals < 60 years old (20 people) and older persons (22 people), and in patients with moderate (22 people) and severe malnutrition (20 people). Positive correlations were established for patients with malnutrition between the parameters of standard evaluation scales and bioimpedance analysis, namely, lean mass ($r = 0.654$, $p < 0.001$), active cellular ($r = 0.875$, $p < 0.001$) and muscle mass ($r = 0.679$, $p < 0.001$). In elderly individuals, a significantly increased percentage of total CD3⁺ cells of cytotoxic T lymphocytes and neutrophils was observed, and, conversely, the number of B lymphocytes and NK cells was decreased ($p < 0.05$). Moreover, the number of naive cells (CD45RA) was decreased and the number of memory cells (CD45RO) increased. A negative correlation was established between the presence of malnutrition in patients and the number of CD45RA⁺ from CD3⁺ cells and their CD4⁺ subpopulation ($r_{CD3^+} = -0.692$, $r_{CD4^+} = -0.595$). On the contrary, a positive correlation was revealed with levels of CD45RO⁺T lymphocytes ($r_{CD3^+} = 0.714$, $r_{CD4^+} = 0.718$, respectively). With increased severity of malnutrition, the neutrophil-to-lymphocyte ratio were found to be significantly decreased ($p < 0.05$). In elderly people, compared to young persons, we have found an increased number of neutrophils, cytotoxic T lymphocytes, and, conversely, lower numbers of B lymphocytes and NK cells ($p < 0.05$). In elderly patients with malnutrition, compared to young people, the number of naive lymphocytes and CD8⁺T memory cells is decreased, and the number of CD4⁺T memory cells is significantly higher. The indexes of systemic inflammation in elderly patients correlate with degree of malnutrition.

Keywords: immunosenescence, inflamaging, malnutrition, lymphocytes, naive cells, memory cells

Исследование выполнено при финансовой поддержке: Министерства здравоохранения Российской Федерации согласно государственному заданию № 056-00055-24-00 «Структурные и клеточно-молекулярные механизмы возрастного ремоделирования соединительной ткани при заболеваниях опорно-двигательного аппарата».

Введение

Сложный динамический процесс иммуностарения (immunosenescence) характеризуется значительными изменениями компонентов и функций врожденной и приобретенной защи-

ты организма, а также системы цитокинов при возрастном непрерывном истощении иммунных клеток на фоне хронической антигенной перегрузки и снижении числа наивных [7, 8]. При негативном воздействии этого процесса на организм возникает вялотекущее асептическое хроническое «возрастное воспаление» (инфламейджинг) с прогрессирующим снижением продукции эффективных антител против патогенов и при вакцинации [8]. На фоне снижения продукции половых стероидов, субклинических расстройств (атеросклероз) и бессимптомной бактериурии отмечается повышение количества

циркулирующих в крови провоспалительных цитокинов (TNF α , IL-1 и IL-6), числа активированных цитотоксических Т-лимфоцитов и NK-клеток с последующим увеличением уровня маркеров воспаления С-реактивного белка и сывороточного амилоида [6, 12]. В частности, происходит инволюция тимуса со снижением количества Т-клеток и появляются дисфункциональные В- и Т-клетки, моноциты, NK-клетки и нейтрофилы [6, 12]. Кроме того, отмечается нарушение соотношения субпопуляций Т-хелперов 1-го и 2-го типа (Th1/Th2) при проявлении профиля иммунного риска, который характеризуется инвертированным соотношением CD4/CD8 и увеличением количества CD3⁺CD8⁺CD28⁺ клеток [4]. Также на фоне снижения уровня IFN γ и повышения содержания интерлейкинов-4 и 10 возрастает восприимчивость организма к инфекции [4].

Важная проблема общественного здравоохранения — это широко распространенные возрастные заболевания саркопении и дисфагия, которые чаще всего отмечаются в коморбидности у немощных пожилых людей, приводя к обезвоживанию и недоеданию. «Саркопеническая дисфагия» характеризуется нарушением глотания из-за потери массы и силы глотательных мышц и может быть связана с плохим состоянием здоровья полости рта по причине прямого нарушения функций иммунной системы и процессов репарации тканей [4, 10]. Причем несбалансированное состояние, возникающее в результате недостаточного потребления питательных веществ для удовлетворения нормальных физиологических потребностей, мальнотриция, усугубляет иммунную дисфункцию, вызывая различные неблагоприятные события [5]. Распространенность недоедания среди пожилых людей составляет 3,1% в обществе, тогда как среди госпитализированных пациентов — 22% [1]. Несмотря на сложную этиологию патогенеза мальнотриции, показано, что воспаление является ее ключевым фактором [9]. Инфламейджинг, вызванный длительными хроническими заболеваниями, оказывает влияние на нервные центры и аппетит, вызывая катаболизм белков поперечно-полосатых мышц, нарушая функции желудочно-кишечного тракта и контролируя гормоны, связанные с голодом [5]. Для скрининга мальнотриции у пожилых людей используется анкетирование с включением показателя индекса массы тела (ИМТ), который вычисляется на основании измерения роста и веса. Показана корреляция между результатами опроса по мини-оценке питания, ИМТ и показателем соотношения нейтрофилов к лимфоцитам [1, 2, 9]. Также в качестве независимого фактора риска недоедания или неполно-

ценного питания у пожилых людей был предложен системный индекс иммунного воспаления (OR 3,984, 95% CI: 2,426–6,543, $p < 0,001$) [10]. Тем не менее остается под вопросом, сопровождается ли инфламейджинг вышеуказанную патологию, тогда как оценка состояния клеток может помочь понять иммуноопосредованные механизмы патогенеза мальнотриции, связанной с возрастными изменениями организма. Цель исследования: определение субпопуляций CD4⁺ и CD8⁺Т-лимфоцитов, В-клеток и числа наивных и клеток памяти при мальнотриции.

Материалы и методы

Образцы крови (ЭДТА 4 мл) были получены от 20 здоровых доноров (возраст ≤ 60 лет), 22 (лица без признаков мальнотриции, сопоставимые по полу и возрасту основной группе, возраст > 60 лет) и 42 пациентов с патологией (возраст > 60 лет). Все участники, включенные в исследование, проведенное в соответствии с этическими принципами Хельсинкской декларации и одобренным Междисциплинарным комитетом по этике ФГБОУ ВО ТГМУ Минздрава (протокол № 2 от 12.11.2023), подписали форму информированного согласия. Образцы крови пациентов были собраны в поликлинике ГБУЗ ККБ № 2 и КГБУЗ «Госпиталь для ветеранов войн» (г. Владивосток). Для всех обследуемых лиц проведена комплексная гериатрической оценка, включая параметры антропометрических измерений (ИМТ, окружность плеча и голени, вес), потребления питательных веществ, общего состояния (биологический возраст, самооценка здоровья, субъективный анализ физического и психического здоровья, качество жизни, повседневная и инструментальная активность жизни по индексу Бартела и шкале Лоутона). Помимо этого, был проведен биоимпедансный анализ для оценки абсолютных и относительных базовых параметров тела (количество жировой и мышечной ткани, процент жировой массы, соотношение внутри- и внеклеточной жидкости).

Из периферической крови обследуемых выделяли суспензию ядросодержащих клеток, затем к 100 мкл суспензии, содержащей 1×10^6 кл/мл, вносили 5 мкл мышинных меченных моноклональных антител против антигенов человека CD3 Brilliant Violet 421™, CD4 FITC, CD8 APC, CD45RA PE/Cyanine5, CD45RO PE/Cyanine5, CD19 FITC, CD27 APC, CD14 FITC, CD16 Alexa Fluor® 647, CD11a (LFA-1) FITC и коктейля антител CD3 FITC/CD16⁺CD56 PE (Elabscience, Китай). После инкубирования в течение 10 мин в темноте удаляли несвязанные антитела путем промывания и центрифугирования и проводили оценку количества флуоресцирующих

клеток с помощью проточного цитофлуориметра MACSQuant TM 10 (Miltenyi Biotec GmbH, Германия). Настройки прибора и гейтирование клеток проводили согласно принятым протоколам, данные анализировали, набирая не менее 30 000 событий. Обработку результатов проводили с использованием программ MACSQuantify™ Software v. 2.5 (Miltenyi Biotec GmbH, Германия) и Kaluza™ v. 1.2 (Beckman Coulter, США). В качестве контроля использован фосфатно-солевой буфер (PBS).

Статистический анализ. Для определения различий частоты подмножеств между показателями и наличием мальнутриции использовали непараметрические критерии Уилкоксона, Манна-Уитни и коэффициент корреляции Спирмена. Данные представлены как медианы и квартили. Анализы проводились с привлечением программы Stata 13.1 (IBM, США).

Результаты и обсуждение

К недостаточности питания (мальнутриции) у пациентов пожилого и старческого возраста относится патологическое состояние, обусловленное несоответствием поступления и расхода питательных веществ, в результате которого снижается масса тела и функциональность. Согласно оценке состояния пациентов по показателям шкал с выявлением недостаточности питания и скрининга нутритивного риска, обследуемые лица были распределены на группы без мальнутриции, с умеренной и тяжелой степенью выраженности. Был проведен биоимпедансный анализ, где в качестве исходных данных использовались результаты оценки абсолютных и относительных базовых параметров тела. На основании антропометрических замеров (рост, вес, обхват талии, обхват бедер) рассчитывались нормативные параметры, а после измерения показателей электрической проводимости тканей получали истинные значения параметров. Результаты представлены в виде коэффициента соотношения нормативных и реальных показателей (табл. 1). Установлены положительные корреляции для пациентов с мальнутрицией между показателями стандартных шкал и биоимпедансного анализа, а именно, безжировой ($r = 0,654$, $p < 0,001$), активной клеточной ($r = 0,875$, $p < 0,001$) и мышечной массами ($r = 0,679$, $p < 0,001$). Несмотря на высокий ИМТ при умеренной степени мальнутриции, коэффициенты состояния мышечной ткани (табл. 1), достоверно были ниже значений для здоровых лиц ($p < 0,01$), как и пациентов с тяжелой степенью при значениях ИМТ приближенных к норме. Эти данные демонстрируют, что метод биоимпедансного анализа по сравнению

со стандартными шкалами позволяет обнаружить большее количество лиц с риском недоедания.

У пожилых лиц установлено достоверное повышение процента нейтрофилов и цитотоксических Т-лимфоцитов от общего числа $CD3^+$ клеток, и, напротив, снижение количества В-лимфоцитов и NK-клеток ($p < 0,05$) (табл. 2). Согласно экспрессии на клеточной поверхности различных изоформ молекулы $CD45RA$ и $CD45R0$ возможно распределение лимфоцитов на наивные ($CD45RA^+CD45R0^-$) и клетки памяти ($CD45RA^-CD45R0^+$). Способностью активно отвечать на повторный контакт с антигеном обладают клетки, экспрессирующие $CD45R0^+$, что является их функциональным отличием от наивных предшественников. Определено, что с возрастом отмечается снижение количества наивных клеток ($CD45RA$) и повышение числа клеток памяти ($CD45R0$) (табл. 2). Причем у пожилых лиц при умеренной и высокой степени мальнутриции, по сравнению с молодой (≤ 60 лет) когортой, в субпопуляции Т-хелперов ($CD3^+CD4^+$) обнаружено значимое снижение количества наивных клеток и, соответственно, повышение числа Т-лимфоцитов памяти. Выявлена отрицательная корреляция между наличием мальнутриции у пациентов и количеством $CD45RA^+$ от $CD3^+$ клеток и их $CD4^+$ субпопуляции ($r_{CD3^+} = -0,692$, $r_{CD4^+} = -0,595$) и, напротив, положительная с показателями $CD45R0^+$ Т-лимфоцитов, ($r_{CD3^+} = 0,714$, $r_{CD4^+} = 0,718$ соответственно). В отношении цитотоксической популяции Т-лимфоцитов обнаружено, что у пациентов с мальнутрицией снижается количество как наивных, так и клеток памяти ($r_{CD45RA^+} = -0,634$, $r_{CD45R0^+} = -0,709$).

После контакта трансмембранного лиганда с $TNF\alpha$, $CD27^+$ В-клетки обладают способностью вырабатывать иммуноглобулин. Значительные различия в зависимости от возраста были обнаружены относительно субпопуляций В-клеток наивных ($53,8 \pm 13,0$ против $36,5 \pm 12,8$; $p < 0,05$) и памяти ($29,1 \pm 13,9$ против $7,26 \pm 10,64$; $p < 0,05$), а также активированных В-лимфоцитов, число которых у пожилых лиц снижалось (табл. 2). Согласно нашим данным, достоверно снижался гематологический параметр системного воспаления соотношение нейтрофилов к лимфоцитам у пациентов с нарастанием степени выраженности мальнутриции (табл. 2). Это состояние является результатом сложного взаимодействия между хроническим воспалением и физиологическими изменениями, связанными со старением [2, 6, 9].

Патогенез неполноценного питания у пожилых людей в настоящее время малоизвестен. Существует предположение, что сначала старение запускает хронический воспалительный процесс,

ТАБЛИЦА 1. КОЭФФИЦИЕНТ СООТНОШЕНИЯ НОРМАТИВНЫХ И РАСЧЕТНЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ БИОИМПЕДАНСНОГО АНАЛИЗА

TABLE 1. THE COEFFICIENT OF THE RATIO NORMATIVE AND CALCULATED INDICATORS OF BIOIMPEDANCE ANALYSIS

Показатели, % Indicators, %	Без мальнотриции Without malnutrition (n = 22)	Умеренная степень мальнотриции Moderate malnutrition (n = 22)	Тяжелая степень мальнотриции Severe malnutrition (n = 20)
Индекс массы тела Body mass index	31,8 (23,3-37,1)	31,6 (26,0-43,8)	26,2 (19,1-31,1)*
Основной обмен веществ, ккал Basal metabolic rate, kcal	1,5 (0,06-3,40)	1,2 (1,06-1,40)*	1,1 (0,9-1,2)*
Жировая масса, кг Fat mass, kg	1,1 (1,01-1,20)	1,7 (1,06-3,50)*	1,3 (0,5-2,1)*
Безжировая масса, кг Lean mass, kg	1,1 (1,01-1,20)	0,9 (0,9-1,1)*	0,9 (0,9-1,0)*
Содержание жидкостей, л Liquid content, L	1,2 (0,9-1,3)	1,0 (0,9-1,0)	0,9 (0,8-0,9)*
Количество общей воды, л Total water volume, L	1,2 (1,0-1,4)	1,1 (1,0-1,4)	1,0 (0,9-1,2)*
Активная клеточная масса, кг Active cell mass, kg	1,2 (0,9-1,4)	1,0 (0,9-1,3)*	0,8 (0,6-0,9)*
Активная клеточная масса, % Active cell mass, %	49,5 (40-62)	42,6 (36-46)*	39,9 (37-44)*
Мышечная масса, кг Muscle mass, kg	1,2 (0,9-1,4)	0,9 (0,8-1,0)*	0,7 (0,6-0,8)*

Примечание. Коэффициент достоверности различий между показателями здоровых лиц и пациентов, * – $p < 0,01$.

Note. Coefficient of reliability of differences between indicators of healthy individuals and patients, *, $p < 0.01$.

затем инициация продукции провоспалительных цитокинов, которые оказывают воздействие на нервный центр и эндокринную систему, увеличивают риск недостаточного потребления питательных веществ [6, 7]. Иммунное старение является следствием возрастного снижения жизнеспособности и точности адаптивной иммунной системы, в основном по причине дегенерации тимуса, вследствие которого происходит изменение функций субпопуляций Т-лимфоцитов [13]. Системный пул этих клеток поддерживается путем формирования в тимусе наивных клеток, возникновением Т-клеток памяти при иммунном ответе и гомеостатической пролиферации как тех, так и других [11]. После выхода наивные Т-клетки проходят периферическую положительную селекцию под влиянием комплекса гистосовместимости периферических аутопептидов иммунных клеток, после чего пролиферируют и приобретают статус зрелых наивных Т-клеток с экспрессией маркеров, типичных для них, в том числе и CD45RA [8]. Нами определено, что с увеличением возраста обнаруживается снижение числа общих и наивных Т-клеток как в популяциях CD4⁺, так и в популяциях CD8⁺Т-клеток. Особенно очевидно показано для клеток с наивным

фенотипом, поскольку CD4⁺ и CD8⁺Т-клетки в 2 и 1,5 раза соответственно снижались у пациентов с мальнотрицией по сравнению с молодыми людьми. Количество CD4⁺Т-клеток памяти значительно увеличивалось с возрастом, тогда как число Т-клеток памяти CD8⁺, напротив, снижалось. По мере старения организма вклад тимуса в поддержание пула Т-клеток становится все меньше и в результате гомеостатической пролиферации изрядную долю CD45R0-клеток составляют суррогатные клетки памяти. С одной стороны, они конкурируют за выживание с истинными клетками памяти, обеспечивающими иммунную защиту пожилым людям, а с другой — могут спровоцировать аутоиммунную патологию [4].

Высокий уровень недоедания, наблюдаемый у лиц с повышенными показателями соотношения нейтрофилов к лимфоцитам и мальнотрицией, может быть результатом возрастного инфламейджинга, связанного с наличием сопутствующих заболеваний [3, 12]. С возрастом иммуновоспаление нарастает в корреляции с хроническими заболеваниями и может привести к физиологическим изменениям, которые влияют на статус питания [6]. При этом обнаруживается высокая продукция цитокинов, которые регулируют коли-

ТАБЛИЦА 2. ПОКАЗАТЕЛИ КЛЕТОЧНОГО ИММУНИТЕТА

TABLE 2. CELLULAR IMMUNITY INDICATORS

Показатели, % от целевой популяции клеток Indicators, % of target cell population	Здоровые лица (≤ 60 лет) Healthy participants (≤ 60 years, n = 20)	Здоровые лица (> 60, n = 22) Healthy participants (> 60, n = 22)	Пациенты с мальнутрицией Patients with malnutrition	
			умеренная степень moderate degree (n = 22)	высокая степень high degree (n = 20)
CD3⁺T клетки CD3 ⁺ T cells	67,5 (55-80)	71,3 (63-74)	74,06 (70-77)	70,01 (67-72)
CD3⁺CD45RA⁺CD45RO⁻T-клетки наивные CD3 ⁺ CD45RA ⁺ CD45RO ⁻ T cells naive	49 (56-59)	36 (27,0-42,5)*	26,7 (23,0-30,7)*	25,1 (20-36)*
CD3⁺CD45RA⁻CD45RO⁺T-клетки памяти CD3 ⁺ CD45RA ⁻ CD45RO ⁺ T memory cells	28 (19-39)	38 (28-48)*	43 (32-56)*	45 (34-58)*
CD4⁺T-хелперы (Th) CD4 ⁺ T helpers (Th)	36 (34-38)	36,1 (29,0-42,7)	46,2 (38-48)*	36 (31,3-45,6)
CD4⁺CD45RA⁺CD45RO⁻Th-наивные CD4 ⁺ CD45RA ⁺ CD45RO ⁻ Th naive	37,6 (26-50)	36,7 (15-30)*	15,7 (12,7-26,0)*	17,8 (14,4-29,0)*
CD4⁺CD45RA⁻CD45RO⁺Th-памяти CD4 ⁺ CD45RA ⁻ CD45RO ⁺ Th memory	48 (49-73)	45 (51-74)*	72 (59-82)*	74 (56-84)*
CD4⁺CD45RA⁺CD45RO⁺Th-активированные CD4 ⁺ CD45RA ⁺ CD45RO ⁺ Th activated	1,4 (0,7-2,1)	11,7 (7,2-17)*	10,6 (7,3-15)*	13,3 (6,1-19,1)*
CD3⁺,CD8⁺T-цитотоксические CD3 ⁺ ,CD8 ⁺ T cytotoxic	26,5 (24-37)	45,5 (32-51)*	43,7 (35,5-47)*	37,1 (28,6-40)*
CD8⁺CD45RA⁺T-цитотоксические наивные CD8 ⁺ CD45RA ⁺ T cytotoxic naive	54 (43-65)	38 (29-47)*	34 (26-42)*	36 (20-32)
CD8⁺CD45RO⁺T-цитотоксические памяти CD8 ⁺ CD45RO ⁺ T cytotoxic memory	39,5 (22,0-56,6)	27 (22-32)	12,6 (12-15)	12 (10-14)
CD8⁺CD45RA⁺CD45RO⁺T-цитотоксические активированные CD8 ⁺ CD45RA ⁺ CD45RO ⁺ activated T cytotoxic	2,6 (1,0-3,2)	18 (14-26)	46 (22-58)	42 (28-54)
CD19⁺B-лимфоциты CD19 ⁺ B lymphocytes	13 (12-14)	9,12 (7,0-13,1)*	7,37 (5,0-12,9)*	10,25 (6-15)
CD19⁺CD27⁺ активированные В-лимфоциты CD19 ⁺ CD27 ⁺ activated B lymphocytes	5,5 (1,8-44,4)	2,4 (1,8-3,7)*	1,8 (1,5-2,9)*	2,2 (2,1-5,5)
CD3⁺CD16⁺CD56⁺NK-клетки CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺ NK cells	12,5 (10-22)	5,8 (4,3-8,1)*	4,2 (2,7-5,7)*	4,6 (2,6-5,7)*
CD14⁺CD16⁻ моноциты классические CD14 ⁺ CD16 ⁻ classical monocytes	85 (78-88)	93,8 (88,4-96,0)	95,8 (92-97)	96,2 (93-97)
CD14⁺CD16⁺ моноциты воспалительные CD14 ⁺ CD16 ⁺ inflammatory monocytes	5 (2,0-6,6)	6,2 (4,3-11,6)	4,2 (2,9-7,6)	3,8 (3,3-6,1)
Нейтрофилы Neutrophils	60 (47-72)	76,9 (71-82)*	78 (72-84)*	82 (76-88)*

Таблица 2 (окончание)
Table 2 (continued)

Показатели, % от целевой популяции клеток Indicators, % of target cell population	Здоровые лица (≤ 60 лет) Healthy participants (≤ 60 years, n = 20)	Здоровые лица (> 60, n = 22) Healthy participants (> 60, n = 22)	Пациенты с мальнотрицией Patients with malnutrition	
			умеренная степень moderate degree (n = 22)	высокая степень high degree (n = 20)
Нейтрофилы CD11a ⁺ CD16 ⁺ Neutrophils CD11a ⁺ CD16 ⁺	46 (34-52)	55,7 (45-68)*	44,9 (40,0-53,8)*	47 (44-56)
Соотношение нейтрофилов к лимфоцитам Neutrophil to lymphocyte ratio	1,5 (1,0-1,6)	1,8 (1,1-1,9)*	2,4 (1,8-2,6)*	2,2 (1,8-2,4)*

Примечание. * представляет статистическую разницу между показателями здоровых лиц и пациентов, оцененную с помощью апостериорного теста Краскела–Уоллиса при уровне значимости $p < 0.05$.

Note. * represents statistical difference between healthy participants and patients, assessed using Kruskal–Wallis a posteriori test at significance level $p < 0.05$.

чество и функцию воспалительных клеток, таких как нейтрофилы и лимфоциты. По сравнению с менее надежными показателями веса и роста этот параметр — более объективный маркер оценки катаболического статуса у пожилых людей [1, 9, 10]. Тем не менее для того, чтобы подтвердить обоснованность этого предложения, необходимы дальнейшие исследования, включающие комплексные оценки питания, биоимпедансный анализ и когортный метод. Подводя итог, можно сказать, что иммунологическая функция, воспаление и недоедание взаимосвязаны и представляют собой порочный круг. На основании данных различных анкет, вполне рационально думать, что люди с ожирением могут недоедать, но при этом иметь хорошие показатели ИМТ. В этой связи становится разумным оценивать недоедание у пожилых людей с использованием системных воспалительных биомаркеров. Таким образом, мальнотриция у пожилых людей харак-

теризуется снижением числа наивных Т-клеток, повышением CD4⁺Т-клеток памяти и показателя соотношения нейтрофилов к лимфоцитам, что указывает на высокую выраженность у таких пациентов возрастного инфламейджинга.

Выводы

У пожилых людей по сравнению с молодыми установлено повышение числа нейтрофилов, цитотоксических Т-лимфоцитов и, напротив, снижение количества В-лимфоцитов и НК-клеток ($p < 0,05$).

У пожилых пациентов с мальнотрицией по сравнению с молодыми людьми снижаются показатели числа наивных лимфоцитов и CD8⁺Т-клеток памяти, а количество CD4⁺Т-клеток памяти значительно повышается.

Показатель системного воспаления у пожилых пациентов коррелирует со степенью выраженности мальнотриции.

Список литературы / References

1. Avci G.U., Kanat B.B., Can G., Erdincler D.S., Doventas A., Yavuzer H. The relationship between malnutrition and neutrophil-to-lymphocyte ratio in hospitalized older patient. *Bratisl. Lek. Listy*, 2023, Vol. 124, no. 7, pp. 498-502.
2. Borda M.G., Salazar-Londoño S., Lafuente-Sanchis P., Patricio Baldera J., Venegas L.C., Tarazona-Santabalbina F.J., Aarsland D., Martín-Marco A., Pérez-Zepeda M.U. Neutrophil-to-lymphocyte ratio and lymphocyte count as an alternative to body mass index for screening malnutrition in older adults living in the community. *Eur. J. Nutr.*, 2024, Vol. 63, no. 5, pp. 1889-1899.
3. Buonacera A., Stancanelli B., Colaci M., Malatino L. Neutrophil to lymphocyte ratio: an emerging marker of the relationships between the immune system and diseases. *Int. J. Mol. Sci.*, 2022, Vol. 23, no. 7, 3636. doi: 10.3390/ijms23073636.
4. Calder P.C., Ortega E.F., Meydani S.N., Adkins Y., Stephensen C.B., Thompson B., Zwickey H. Nutrition, immunosenescence, and infectious disease: an overview of the scientific evidence on micronutrients and on modulation of the gut microbiota. *Adv. Nutr.*, 2022, Vol. 13, no. 5, pp. S1-S26.
5. de Sire A., Ferrillo M., Lippi L., Agostini F., de Sire R., Ferrara P.E., Raguso G., Riso S., Rocuzzo A., Ronconi G., Invernizzi M., Migliario M. Sarcopenic dysphagia, malnutrition, and oral frailty in elderly: a comprehensive review. *Nutrients*, Vol. 14, no. 5, 982. doi: 10.3390/nu14050982.
6. Di Giosia P., Stamerra C.A., Giorgini P., Jamialahamdi T., Butler A.E., Sahebkar A. The role of nutrition in inflammaging. *Ageing Res. Rev.*, 2022, Vol. 77, 101596. doi: 10.1016/j.arr.2022.101596.

7. Franceschi C., Ostan R., Santoro A. Nutrition and inflammation: are centenarians similar to individuals on calorie-restricted diets? *Annu. Rev. Nutr.*, 2018, Vol. 38, pp. 329-356.
8. Fulop T., Larbi A., Pawelec G., Khalil A., Cohen A.A., Hirokawa K., Witkowski J.M., Franceschi C. Immunology of aging: the birth of inflammaging. *Clin. Rev. Allergy Immunol.*, 2023, Vol. 64, no. 2, pp. 109-122.
9. Kaya T., Açıkgöz S.B., Yıldırım M., Nalbant A., Altaş A.E., Cinemre H. Association between neutrophil-to-lymphocyte ratio and nutritional status in geriatric patients. *J. Clin. Lab. Anal.*, 2019, Vol. 33, no. 1, e22636. doi: 10.1002/jcla.22636.
10. Ma Y.C., Ju Y.M., Cao M.Y., Yang D., Zhang K.X., Liang H., Leng J.Y. Exploring the relationship between malnutrition and the systemic immune-inflammation index in older inpatients: a study based on comprehensive geriatric assessment. *BMC Geriatr.*, 2024, Vol. 24, no. 1, pp. 9-19.
11. Provinciali M., Moresi R., Donnini A., Lisa R.M. Reference values for CD4+ and CD8+ T lymphocytes with naïve or memory phenotype and their association with mortality in the elderly. *Gerontology*, 2009, Vol. 55, no. 3, pp. 314-321.
12. Seshadri G., Vivek S., Prizment A., Crimmins E.M., Klopach E.T., Faul J., Guan W., Meier H.C.S., Thyagarajan B. Immune cells are associated with mortality: the health and retirement study. *Front. Immunol.*, 2023, Vol. 14, 1280144. doi: 10.3389/fimmu.2023.1280144.
13. Xu W., Wong G., Hwang Y.Y., Larbi A. The untwining of immunosenescence and aging. *Semin. Immunopathol.*, 2020, Vol. 42, no. 5, pp. 559-572.

Авторы:

Плехова Н.Г. — д.б.н., доцент, заведующая Междисциплинарным научно-исследовательским центром ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Владивосток, Россия

Кабалык М.А. — к.м.н., заведующий гериатрическим центром, врач-гериатр КГБУЗ «Госпиталь для ветеранов войн», г. Владивосток, Россия

Цветов Н.В. — ассистент Института клинической неврологии и реабилитационной медицины ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Владивосток, Россия

Гороховская П.В. — терапевт, терапевтическое отделение № 2 КГБУЗ «Госпиталь для ветеранов войн», г. Владивосток, Россия

Иванюк М.М. — терапевт, приемное отделение КГБУЗ «Госпиталь для ветеранов войн», г. Владивосток, Россия

Просекова Е.В. — д.м.н., профессор, заведующий кафедрой клинической лабораторной диагностики, общей и клинической иммунологии ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Владивосток, Россия

Бельды Е.С. — лаборант междисциплинарный научно-исследовательский центр ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Владивосток, Россия

Дондокова О.Э. — лаборант Междисциплинарного научно-исследовательского центра ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Владивосток, Россия

Сабыныч В.А. — к.м.н., доцент кафедры клинической лабораторной диагностики, общей и клинической иммунологии ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Владивосток, Россия

Authors:

Plekhnova N.G., PhD, MD (Biology), Associate Professor, Head, Interdisciplinary Research Center, Pacific State Medical University, Vladivostok, Russian Federation

Kabalyk M.A., PhD (Medicine), Head, Geriatric Center, Geriatrician, Hospital for War Veterans, Vladivostok, Russian Federation

Tsvetov N.V., Assistant, Institute of Clinical Neurology and Rehabilitation Medicine, Pacific State Medical University, Vladivostok, Russian Federation

Gorokhovskaya P.V., Therapist, Therapeutic Department No. 2, Hospital for War Veterans, Vladivostok, Russian Federation

Ivanyuk M.M., Therapist, Admission Department, Hospital for War Veterans, Vladivostok, Russian Federation

Prosekova E.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Clinical Laboratory Diagnostics, General and Clinical Immunology, Pacific State Medical University, Vladivostok, Russian Federation

Beldy E.S., Laboratory Assistant, Interdisciplinary Research Center, Pacific State Medical University, Vladivostok, Russian Federation

Dondokova O.E., Laboratory Assistant, Interdisciplinary Research Center, Pacific State Medical University, Vladivostok, Russian Federation

Sabynych V.A., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Clinical Laboratory Diagnostics, General and Clinical Immunology, Pacific State Medical University, Vladivostok, Russian Federation

Поступила 27.03.2025
Отправлена на доработку 09.05.2025
Принята к печати 31.05.2025

Received 27.03.2025
Revision received 09.05.2025
Accepted 31.05.2025

ЦИТОМЕТРИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА КЛЕТОЧНОГО КОМПАРТМЕНТА ИММУННОЙ СИСТЕМЫ У ПАЦИЕНТОВ ПОСЛЕ СКВОЗНОЙ КЕРАТОПЛАСТИКИ

Кузнецов А.А.¹, Быстров А.М.^{1,2}, Давыдова Е.В.^{1,2}, Черешнева М.В.³,
Гаврилова Т.В.⁴

¹ ГБУЗ «Челябинская областная клиническая больница», г. Челябинск, Россия

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

³ ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук, г. Екатеринбург, Россия

⁴ ФГБОУ ВО «Пермский государственный медицинский университет имени академика Е.А. Вагнера» Министерства здравоохранения РФ, г. Пермь, Россия

Резюме. Реакция отторжения трансплантата, особенно у пациентов из группы «высокого риска», представляет собой сложный иммунологический процесс, который остается актуальной проблемой в офтальмологии. Роговица, несмотря на свою иммунологическую привилегированность, при определенных условиях (васкуляризация, воспаление) теряет защитные барьеры, что приводит к развитию иммунного ответа против трансплантата. Ключевыми механизмами отторжения являются активация Т-лимфоцитов (CD4⁺ и CD8⁺), а также нарушение баланса между эффекторными и регуляторными иммунными клетками. Современные методы иммунологического мониторинга, включая анализ популяций Т-клеток, позволяют своевременно выявлять признаки отторжения и корректировать терапию для улучшения долгосрочных результатов трансплантации. Цель исследования — проведение сравнительного цитометрического анализа популяционного и субпопуляционного состава лимфоцитов крови у пациентов после сквозной кератопластики. В исследовании участвовало 46 пациентов, перенесших сквозную кератопластику, которые были разделены на две подгруппы: с отторжением трансплантата (n = 25) и с успешным приживлением (n = 21), а также контрольная группа из 21 здорового добровольца. Иммунологический анализ включал забор венозной крови и количественное определение субпопуляций лимфоцитов методом проточной цитометрии с использованием цитофлуориметра Navios (Beckman Coulter, США) и маркеров CD45⁺ и CD46⁺. Исследовались ключевые популяции лимфоцитов, включая Т-хелперы, цитотоксические Т-лимфоциты, NK-клетки, В-лимфоциты и активированные Т-клетки, для выявления различий в иммунном статусе пациентов. Сравнительный цитометрический анализ популяционного и субпопуляционного состава лимфоци-

Адрес для переписки:

Быстров Алексей Михайлович
ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный
медицинский университет» Министерства
здравоохранения РФ
454092, Россия, г. Челябинск, ул. Воровского, 64.
Тел.: 8 (919) 327-51-78.
E-mail: highvision@bk.ru

Address for correspondence:

Alexey M. Bystrov
South Ural State Medical University
64 Vorovsky St
Chelyabinsk
454092 Russian Federation
Phone: +7 (919) 327-51-78.
E-mail: highvision@bk.ru

Образец цитирования:

А.А. Кузнецов, А.М. Быстров, Е.В. Давыдова,
М.В. Черешнева, Т.В. Гаврилова «Цитометрическая
оценка клеточного компартмента иммунной системы
у пациентов после сквозной кератопластики»
// Российский иммунологический журнал, 2025. Т. 28,
№ 3. С. 837-846.
doi: 10.46235/1028-7221-17113-CEO

© Кузнецов А.А. и соавт., 2025

Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

A.A. Kuznetsov, A.M. Bystrov, E.V. Davydova,
M.V. Cheresheva, T.V. Gavrilova "Cytometric evaluation
of immune cell compartments in patients after penetrating
keratoplasty", Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy
Immunologicheskii Zhurnal, 2025, Vol. 28, no. 3, pp. 837-846.
doi: 10.46235/1028-7221-17113-CEO

© Kuznetsov A.A. et al., 2025

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

DOI: 10.46235/1028-7221-17113-CEO

тов периферической крови у пациентов «высокого риска» с наличием реакции отторжения трансплантата показал ряд значимых изменений в виде увеличения общего количества Т-лимфоцитов, Т-хелперов, Т-цитотоксических, Т-лимфоцитов с маркерами ранней и поздней активации, что свидетельствует о ключевой роли Т-клеточного иммунитета в механизмах развития поздних клеточных реакций отторжения. Полученные данные демонстрируют вовлеченность системных клеточных механизмов в реализацию реакции отторжения нативного аллотрансплантата роговицы и диктуют необходимость более детального изучения Т-клеточного ответа иммунной системы. Цитометрическая оценка субпопуляций иммуноцитов дает возможность выявления ранних признаков иммунной активации, связанной с отторжением и открывает новые возможности для разработки персонализированных и эффективных стратегий лечения, направленных на улучшение исходов трансплантации.

Ключевые слова: роговица, кератопластика, реакция отторжения, кровь, цитометрия, Т-лимфоциты

CYTOMETRIC EVALUATION OF IMMUNE CELL COMPARTMENTS IN PATIENTS AFTER PENETRATING KERATOPLASTY

Kuznetsov A.A.^a, Bystrov A.M.^{a, b}, Davydova E.V.^{a, b}, Cheresheva M.V.^c, Gavrilova T.V.^d

^a Chelyabinsk Regional Clinical Hospital, Chelyabinsk, Russian Federation

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

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

^d E. Wagner Perm State Medical University, Perm, Russian Federation

Abstract. The corneal graft rejection, especially in patients from the “high risk” group, is a complex immunological process that remains an urgent problem in ophthalmology. The cornea, despite its immunological privilege, loses its protective barriers under certain conditions (vascularization, inflammation), which leads to the development of immune reaction against the transplant. The key mechanisms of rejection include activation of T lymphocytes (CD4⁺ and CD8⁺), as well as an imbalance between effector and regulatory immune cells. Modern methods of immunological monitoring, including analysis of T cell populations, make it possible to detect signs of rejection in a timely manner and adjust therapy to improve long-term transplant results. The aim of our study was to conduct a comparative cytometric analysis of the population and subpopulation composition of blood lymphocytes in patients after end-to-end (penetrating) keratoplasty. The study involved 46 patients who underwent penetrating keratoplasty, being divided into two subgroups: those with transplant rejection (n = 25) and those with successful engraftment (n = 21), as well as a control group of 21 healthy volunteers. The immunological analysis included venous blood sampling and quantitative determination of lymphocyte subpopulations by flow cytometry using a Navios cytofluorimeter (Beckman Coulter, USA) and markers of CD45⁺ and CD46⁺ cell populations. Key populations of lymphocytes, including T helper cells, cytotoxic T lymphocytes, NK cells, B lymphocytes, and activated T cells, were studied to identify differences in the immune status of patients. Comparative cytometric analysis of the population and subpopulation composition of peripheral blood lymphocytes in “high-risk” patients with graft rejection showed a number of significant changes manifesting as an increased total number of T lymphocytes, T helper cells, T cytotoxic, T lymphocytes with markers of early and late activation, thus suggesting the key role of T cell-mediated immunity in development of late cellular rejection reactions. The data obtained suggest involvement of systemic cellular mechanisms into rejection of the native corneal allograft, presuming a need for a more detailed study of the T cell response of immune system in this condition. Cytometric assessment of subpopulations of immunocytes makes it possible to identify early signs of immune activation associated with rejection and opens up new opportunities for the development of personalized and effective treatment strategies aimed at improving the transplant outcomes.

Keywords: cornea, keratoplasty, rejection reaction, blood, cytometry, T lymphocytes

Введение

Современные достижения в области микрохирургии глаза и разработка новых препаратов для подавления иммунной активности позволили значительно повысить эффективность трансплантации роговицы, тем не менее иммунопосредованное отторжение остается основной причиной утраты оптических свойств трансплантата. Реакция отторжения трансплантата представляет собой патофизиологический феномен, в основе которого лежит нарушение механизмов иммунной привилегии внутренних сред глаза, обусловленных наличием феномена иммунного отклонения, связанного с передней камерой (ACAID) и аваскулярным состоянием роговицы. Однако существует ряд состояний, при которых эти барьеры способны разрушаться, индуцируя развитие иммунного ответа, направленного против аллогенного трансплантированного материала [8]. У пациентов из группы «высокого риска» с васкуляризованным и/или воспаленным ложем происходит нарушение гематоофтальмического барьера, создающее условия для миграции иммунокомпетентных клеток мукозоассоциированной ткани региона глаза и инициации реакций иммунного реагирования в отношении аллоткани роговицы. Изучение клеточного компартмента системного и локального иммунитета, как ключевых звеньев в цепочке патофизиологических событий при возникновении реакции тканевой несовместимости и отторжения трансплантата является важной задачей современной иммуноофтальмологии и трансплантологии нативных тканей. Среди факторов риска значимые позиции занимают патология глаза, сопровождающаяся явлением неоваскуляризации роговичного ложа, вследствие дисбаланса проангиогенных и антиангиогенных факторов, наличие коморбидной сердечно-сосудистой, соматической, эндокринной патологии, тканевая несовместимость донора и реципиента по антигенам главного комплекса гистосовместимости, наличие аутоантител к структурам глаза, выполнение кератопластики [7].

Иммунная реакция со стороны элементов мукозоассоциированной лимфоидной ткани глаза на появление аллоантигена включает процессы миграции и хоминга иммунных клеток в лимфоидные органы и зону воспаления, опосредуемые хемокинами, молекулами адгезии, провоспалительными цитокинами. Эффекторная клеточная реакция представлена разрушением трансплантата CD8⁺T-лимфоцитами и реакцией замедленной гиперчувствительности, инициируемой CD4⁺T-клетками [3, 7].

Клиническим итогом реакции отторжения является помутнение роговичного трансплантата,

включающее локальные изменения в роговичной архитектонике с образованием эндотелиальных и эпителиальных линий отторжения, формирование субэпителиальных инфильтратов, преципитатов на эндотелии, а также тотальный отек трансплантата [14].

Осуществление динамического иммунологического мониторинга за изменением популяционного и субпопуляционного состава клеточного компартмента иммунной системы у реципиентов «высокого риска» важно исследовать как на этапе подготовки к проведению сквозной кератопластики, так и при наличии реакции отторжения трансплантата, что позволит выявить признаки иммунной дисфункции, что критически важно для принятия своевременных мер профилактики возникновения данного опасного осложнения, выбора оптимальной лечебной стратегии и долгосрочного прогнозирования состояния пациента. Особое внимание при определении субпопуляционного спектра иммуноцитов рекомендовано уделять количественному соотношению субпопуляций Т-хелперов, а именно Th1-, Th17-лимфоцитам, Т-регуляторным клеткам, двойным негативным Т-лимфоцитам (CD4⁺CD8⁺), играющим ключевые роли в процессе отторжения трансплантата [12].

Цель исследования — проведение сравнительного цитометрического анализа популяционного и субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови у пациентов «высокого риска» с наличием реакции отторжения трансплантата и при успешном исходе сквозной кератопластики аллотрансплантатом роговицы.

Материалы и методы

В клинко-иммунологическом исследовании участвовало 46 пациентов с патологией роговицы: васкуляризированные помутнения роговицы (ВПР) в исходе бактериального и вирусного кератита (n = 24), ВПР посттравматические (n = 12), обширные язвенные дефекты с угрозой перфорации (n = 10), которым на базе регионального офтальмологического центра ГБУЗ «Челябинская областная клиническая больница» проводилась сквозная кератопластика с 2019 по 2023 год. Данные пациенты составили основную (1) группу исследования, представленную 46 пациентами в возрасте от 36 лет до 61 года (средний возраст — 49,1±5,4 года), 29 из которых мужчины (66%) и 17 женщины (34%). Всем пациентам проводилась сквозная кератопластика по стандартной технологии с наложением непрерывного кругового шва [2]. Осложнений во время операции не было. Время от забора донорского материала до операции составило от 18 до 24 часов. Во всех случаях использовался консервированный

донорский материал. Консервация роговичных дисков проводилась в среде Борзенка—Мороз, при планировании кератопластики реципиентам подбор донора по системам МНС и АВ0 не проводился. Забор крови для иммунологического исследования осуществлялся при обнаружении у пациентов признаков отторжения в пробирки Vacuette® с добавлением антикоагулянта K3EDTA (Greiner-Bio-One, Австрия). При отсутствии у пациентов в течение года реакции отторжения забор крови для иммунологического исследования производили по окончании периода наблюдения (12 мес.).

Ретроспективно были сформированы две подгруппы: 1а подгруппу ($n = 25$) составили пациенты с зафиксированным клинически и инструментально эпизодом отторжения роговичного трансплантата на сроке от 2 до 8 месяцев после хирургического лечения, мужчин было 14 (56%), женщин — 11 (44%), средний возраст — $52,3 \pm 4,7$ года; 1б подгруппу ($n = 21$) составили пациенты с прозрачным приживлением трансплантата роговицы, мужчин было 15 (71%), женщин — 6 (29%), средний возраст $48,4 \pm 5,2$ года). Критериями исключения из исследования явились: диагностированные аутоиммунные патологии, состояния, связанные с нарушением функции иммунной системы, инфекционные заболевания (как острые, так и хронические) в период обострения, наличие злокачественных новообразований, а также сопутствующие заболевания глаз, включая сосудистые, воспалительные и дегенеративные изменения сетчатки и зрительного нерва. Наличие хронических болезней в стадии ремиссии в обеих подгруппах были схожими, что соответствует условиям исследования и обеспечивает сравнимость данных групп. Так, в 1а и 1б подгруппах коморбидная патология распределилась следующим образом: гипертоническая болезнь I, II степени — 10 (40%) и 8 (38%) случаев; сахарный диабет 2-го типа — 8 (32%) и 11 (52%) случаев; бронхиальная астма — 5 (20%) и 4 (19%) случая; хроническая обструктивная болезнь легких — 3 (12%) и 5 (24%) случаев; хронический гастрит — 15 (60%) и 11 (52%) случаев; аллергические заболевания — 4 (16%) и 6 (29%) случаев, соответственно. Контрольная группа состояла из 21 здорового добровольца (13 мужчин, 8 женщин) без офтальмологической и соматической патологии, средний возраст $51,8 \pm 2,6$ года. Исследование одобрено решением Этического комитета ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России (протоколы № 8 от 02.10.2019; № 7 от 05.11.2024).

Для проведения иммунологического анализа забор венозной крови осуществляли из локтевой вены в утреннее время, строго натощак. Количественное определение популяционного и субпо-

пуляционного состава лимфоцитов выполняли методом проточной цитометрии с использованием цитофлюориметра Navios (Beckman Coulter, США) по стандартизированной технологии оценки лимфоцитарного звена иммунитета [1]. Для гейтирования лимфоцитов применяли панлейкоцитарные маркеры CD45⁺ и CD46⁺. В ходе исследования анализировали следующие субпопуляции лимфоцитов: маркеры CD45⁺ и CD46⁺, CD3⁺ (Т-лимфоциты), CD45⁺ и CD46⁺, CD3⁺, CD4⁺ (Т-хелперы), CD45⁺ и CD46⁺, CD3⁺, CD8⁺ (цитотоксические Т-лимфоциты), CD45⁺ и CD46⁺, CD3⁺, CD56⁺ (ТНК-клетки) CD45⁺ и CD46⁺, CD3⁺, CD56⁺ (натуральные киллеры), CD45⁺ и CD46⁺, CD3⁺, CD19⁺, CD5⁺ (В-лимфоциты), CD45⁺ и CD46⁺, CD3⁺, CD4⁺, CD25⁺ (активированные хелперы, ранняя активация лимфоцитов), CD45⁺ и CD46⁺, CD3⁺, HLA-DR (активированные Т-лимфоциты — поздняя активация лимфоцитов).

Для статистической обработки материала использовали пакет прикладных программ Statistica for Windows vers. 10.0 (StatSoft Inc., США), с определением медианы и интерквартильного размаха — Me ($Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$). Значимость различий оценивали согласно критериям непараметрической статистики (U-test Манна–Уитни), статистически значимыми считались изменения при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Полученные данные проведенных исследований клеточного компартмента иммунной системы у пациентов, перенесших сквозную кератопластику, представлены в таблице 1.

Результаты исследования демонстрируют существенные различия в популяционном и субпопуляционном составе лимфоцитов между исследуемыми группами.

В подгруппе 1а зафиксировано значительное увеличение общего числа Т-лимфоцитов (CD45⁺CD3⁺CD19⁺) в сравнении с подгруппой 1б и контрольной группой. В подгруппе с эпизодом отторжения трансплантата также было отмечено значительное повышение как относительного, так и абсолютного числа Т-хелперов (CD45⁺CD3⁺CD4⁺). Аналогичная картина наблюдалась для Т-цитотоксических лимфоцитов (CD45⁺CD3⁺CD8⁺). Напротив, соотношение CD4⁺/CD8⁺ в подгруппе 1а оказалось ниже по сравнению с подгруппой прозрачного приживления и контрольной группой.

Относительное и абсолютное количество ТНК-лимфоцитов (CD46⁺CD3⁺CD16⁺CD56⁺) и НК-клеток (CD45⁺CD3⁺CD16⁺CD56⁺) не выявило значимых различий между группами. Число ТНК-лимфоцитов сопоставимо во всех иссле-

ТАБЛИЦА 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ПОПУЛЯЦИОННОГО И СУБПОПУЛЯЦИОННОГО СОСТАВА ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПАЦИЕНТОВ, ПЕРЕНЕСШИХ СКВОЗНУЮ КЕРАТОПЛАСТИКУ, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 1. CHARACTERISTICS OF THE POPULATION AND SUBPOPULATION COMPOSITION OF PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES OF PATIENTS WHO UNDERWENT END-TO-END KERATOPLASTY, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

Параметр Parameter	Основная группа Main group n = 46		Контрольная группа Control n = 21
	Подгруппа 1а Subgroup 1a n = 25	Подгруппа 1б Subgroup 1b n = 21	
Общее количество Т-лимфоцитов (CD45⁺CD3⁺CD19⁻), отн., % Total number of T lymphocytes (CD46 ⁺ CD3 ⁺ CD19 ⁻), relative, %	81,2 (78,7-86,7)*, **	74,3 (72,1-76,7)	74,6 (72,9-75,6)
Общее количество Т-лимфоцитов (CD45⁺CD3⁺CD19⁻), абс., 10⁶ кл/л Total number of T lymphocytes (CD46 ⁺ CD3 ⁺ CD19 ⁻), abs., 10 ⁶ cells/L	2301,1 (2040-2578)*, **	1783,6 (1580-1992)	1611,4 (1410-1835)
Т-хелперы (CD45⁺CD3⁺CD4⁺), отн., % T helpers (CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD4 ⁺), relative, %	36,9 (36,4-41,1)	33,2 (31,2-37,0)	31,3 (24,7-33,7)
Т-хелперы (CD45⁺CD3⁺CD4⁺), абс., 10⁶ кл/л T helpers (CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD4 ⁺), abs., 10 ⁶ cells/L	881,6 (861,1-1025,8)*, **	748,5 (621,2-849,1)	751,4 (621,2-849,1)
Т-цитотоксические (CD45⁺CD3⁺CD8⁺), отн., % T cytotoxic (CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD8 ⁺), relative, %	29,8 (25,4-29,1)	26,3 (23,7-29,3)	25,6 (18,9-29,1)
Т-цитотоксические (CD45⁺CD3⁺CD8⁺), 10⁶ кл/л T cytotoxic (CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD8 ⁺), 10 ⁶ cells/L	556,8 (380,2-649,1)	540,2 (429,1-652,3)	514,2 (472,3-572,3)
Соотношение CD4⁺/CD8⁺, 10⁹/л CD4 ⁺ /CD8 ⁺ ratio, 10 ⁹ /L	0,98 (0,88-1,19)	1,08 (0,83-1,31)	1,06 (0,81-1,30)
TNK-лимфоциты (CD46⁺CD3⁺CD16⁺CD56⁺), отн., % TNK lymphocytes (CD46 ⁺ CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺), relative, %	2,21 (1,52-3,24)*, **	1,75 (1,57-2,18)	1,82 (1,57-2,18)
TNK-лимфоциты (CD46⁺CD3⁺CD16⁺CD56⁺), абс., 10⁶ кл/л TNK lymphocytes (CD46 ⁺ CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺), abs., 10 ⁶ cells/L	65,5 (57,2-75,4)	62,4 (54,1-71,4)	63,3 (59,7-68,6)
НК-клетки (CD45⁺CD3⁺CD16⁺CD56⁺), отн., % NK cells (CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺), relative, %	8,4 (7,6-9,3)	8,1 (7,3-8,9)	8,2 (7,5-8,9)
НК-клетки (CD45⁺CD3⁺CD16⁺CD56⁺), абс., 10⁶ кл/л NK cells (CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺), abs., 10 ⁶ cells/L	246,2 (222,9-277,5)	233,2 (211,9-255,7)	236,2 (217,9-257,7)
Т-лимфоциты CD45⁺CD3⁺CD4⁺CD25⁺ (ранняя активация), отн., % T lymphocytes CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁺ (early activation), relative, %	17,1 (12,5-20,2)*, **	13,1 (9,5-15,2)	10,2 (8,6-11,3)
Т-лимфоциты CD45⁺CD3⁺CD4⁺CD25⁺ (ранняя активация), 10⁹ кл/л T lymphocytes CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁺ (early activation), 10 ⁹ cells/L	144,7 (121,4-162,3)*, **	110,3 (94,6-132,4)	87,8 (68,8-102,6)
Т-лимфоциты CD45⁺CD3⁺CD4⁺HLA-DR⁺ (поздняя активация), отн., % T lymphocytes CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD4 ⁺ HLA-DR ⁺ (late activation), relative, %	3,34 (1,95-4,44)*, **	1,71 (1,15-3,22)	1,36 (0,95-1,54)

Таблица 1 (окончание)
Table 1 (continued)

Параметр Parameter	Основная группа Main group n = 46		Контрольная группа Control n = 21
	Подгруппа 1а Subgroup 1a n = 25	Подгруппа 1б Subgroup 1b n = 21	
Т-лимфоциты CD45⁺CD3⁺CD4⁺HLA-DR⁺ (поздняя активация), 10⁶ кл/л T lymphocytes CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD4 ⁺ HLA-DR ⁺ (late activation), 10 ⁶ cells/L	91,2 (80,1-111,3)*. **	52,3 (41,6-67,3)	44,4 (37,2-53,5)
Т-регуляторные клетки (CD45R0⁺CD3⁺CD4⁺CD25⁺CD127⁻), отн., % T regulatory cells (CD45R0 ⁺ CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD127 ⁻), relative, %	3,5 (2,6-4,7)*. **	2,4 (2,0-2,6)	2,1 (1,9-2,3)
Т-регуляторные клетки (CD45R0⁺CD3⁺CD4⁺CD25⁺CD127⁻), 10⁶ кл/л T regulatory cells (CD45R0 ⁺ CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD127 ⁻), 10 ⁶ cells/L	54,1 (52,1-58,4)*. **	49,3 (38,3-51,5)	48,5 (40,6-50,4)
Т-регуляторные клетки поздняя активация (CD45R0⁺CD3⁺CD4⁺CD25⁺CD127⁻HLA-DR⁺), отн., % T regulatory cells late activation (CD45R0 ⁺ CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD127 ⁻ HLA-DR ⁺), relative, %	2,63 (1,92-3,29)*. **	1,78 (1,40-1,91)	1,34 (0,95-1,62)
Т-регуляторные клетки поздняя активация (CD45R0⁺CD3⁺CD4⁺CD25⁺CD127⁻HLA-DR⁺), абс., 10⁶ кл/л T regulatory cells late activation (CD45R0 ⁺ CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD127 ⁻ HLA-DR ⁺), abs., 10 ⁶ cells/L	13,5 (11,2-15,4)*. **	11,13 (9,12-13,30)	10,3 (9,4-11,8)
Общее количество В-лимфоцитов (CD45⁺CD3⁺CD19⁺), отн., % Total number of B lymphocytes (CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD19 ⁺), relative, %	10,2 (9,4-10,5)	9,7 (9,0-9,9)	9,4 (9,0-9,7)
Общее количество В-лимфоцитов (CD45⁺CD3⁺CD19⁺), 10⁶ кл/л Total number of B lymphocytes (CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD19 ⁺), 10 ⁶ cells/L	329,5 (301,2-362,2)	321,5 (291,2-353,2)	316,6 (279,2-318,2)

Примечание. * – значимые (p < 0,05) различия с контрольной группой; ** – с подгруппой 1б.

Note. *, significant (p < 0.05) differences with the control group; **, with subgroup 1b.

дующих группах. Точно так же количество НК-клеток в подгруппе отторжения не отличалось статистически значимо от других групп.

В подгруппе 1а зарегистрировано значительное увеличение как относительного, так и абсолютного числа активированных Т-лимфоцитов. Количество Т-лимфоцитов с маркерами ранней активации (CD45⁺CD3⁺CD4⁺CD25⁺) оказалось выше, чем в подгруппе 1б и в контрольной группе. Для Т-лимфоцитов с маркерами поздней активации (CD45⁺CD3⁺CD4⁺HLA-DR⁺) оба количественных показателя в подгруппе 1а значительно превысили подгруппы 1б и контрольную группу.

Относительное и абсолютное количество Т-регуляторных клеток (CD45R0⁺CD3⁺CD4⁺CD25⁺CD127⁻) оказалось несколько выше в подгруппе 1а. Для Т-регуляторных клеток с поздней активацией (CD45R0⁺CD3⁺CD4⁺CD25⁺CD127⁻HLA-DR⁺) также наблюдалось увеличение в подгруппе 1а, превышающее показатели подгруппы 1б и контрольной группы.

Общее количество В-лимфоцитов (CD45⁺CD3⁺CD19⁺) не продемонстрировало значимых различий между группами.

Результаты исследования показали значительное увеличение общего количества Т-лимфоцитов (CD45⁺CD3⁺CD19⁺), субпопу-

лений с маркерами ранней и поздней позитивной активации ($CD4^+CD25^+$, $CD4^+HLADR^+$) у пациентов с реакцией отторжения роговичного трансплантата, что согласуется с современными представлениями о ключевой роли Т-клеток, преимущественно $CD4^+$ Т-хелперов и $CD8^+$ цитотоксических Т-клеток, в механизмах отторжения трансплантата [15]. Известно, что при трансплантации роговицы донорская ткань экспрессирует чужеродные антигены, которые распознаются Т-клетками реципиента через взаимодействие с молекулами главного комплекса гистосовместимости (МНС) класса I и II типа на антиген-презентирующих клетках (APC), таких как дендритные клетки и макрофаги. Т-хелперы идентифицируют антигены, представленные МНС класса II, в то время как $CD8^+$ Т-клетки взаимодействуют с антигенами МНС класса I. Прочность связи придают ко-стимулирующие молекулы $CD28$ на Т-лимфоцитах и $B7$ на APC [11, 15].

Активированные $CD4^+$ Т-хелперы в зависимости от цитокинового окружения дифференцируются в Th1, Th2, Th17 или Treg. При реакции отторжения преобладает дифференцировка в Th1- и Th17-клетки, секретирующие провоспалительные цитокины $IFN\gamma$, IL-2, $TNF\alpha$ и IL-17. Данные цитокины усиливают воспалительный ответ, стимулируют рекрутинг и активацию неспецифических клеточных популяций: макрофагов, нейтрофилов, НК-клеток, механизм действия которых основан на индукции каскадной реакции, приводящей к высвобождению различных медиаторов, среди которых преобладают активные формы кислорода и протеазы. Суммарная активность медиаторов воспаления вызывает повреждение эндотелия роговицы и стромы, а результирующими эффектами становятся потеря прозрачности трансплантата и клинические проявления реакции отторжения [15].

Увеличение количества $CD8^+$ Т-клеток у пациентов с отторжением трансплантата в подгруппе 1a может указывать на их роль в патогенезе отторжения. После активации $CD8^+$ Т-лимфоциты приобретают цитотоксические свойства, выделяя перфорин и гранзимы, которые индуцируют апоптоз клеток-мишеней. Помимо прямой цитотоксической активности, активированные $CD8^+$ лимфоциты способны вырабатывать значительное количество провоспалительных цитокинов, в частности $IFN\gamma$ способствует усилению экспрессии молекул главного комплекса гистосовместимости, что обеспечивает более эффективное презентирование аллоантигенов [6].

Полученные нами данные о концентрациях $CD4^+$, $CD8^+$ Т-клеток согласуются с результатами экспериментальных исследований, где в моделях отторжения роговицы в периферической

крови мышей наблюдалось значительное увеличение $CD4^+$, $CD8^+$ — популяций Т-лимфоцитов. F. Boissier и соавт. (2001) экспериментально показали, что у мышей, демонстрирующих реакцию отторжения роговичного трансплантата, наблюдался мощный ответ Т-клеток, связанный с активацией аллореактивных клонов $CD4^+$ Т-лимфоцитов, продуцирующих интерлейкин-2 (IL-2), и аллореактивных $CD8^+$ Т-клеток, продуцирующих интерферон- γ $IFN\gamma$ [5].

Известно, что на ранних этапах активации Т-клетки экспрессируют рецепторы к IL-2 — маркеру ранней активации лимфоцитов, максимальная плотность рецепторов которого появляется через несколько часов после их взаимодействия с антигеном [9]. По мере развития иммунного ответа Т-клетки экспрессируют дополнительные маркеры активации, включая антиген главного комплекса гистосовместимости II класса HLA-DR, и приобретают фенотип $CD45^+CD3^+CD4^+HLA-DR^+$. Экспрессия HLA-DR свидетельствует о переходе в более позднюю стадию активации и связана с установлением высокой функциональной активности клеток. HLA-DR $^+$ Т-клетки обеспечивают секрецию широкого спектра провоспалительных цитокинов, таких как $IFN\gamma$, $TNF\alpha$ и IL-2, усиливая локальное воздействие и непосредственно участвуя в повреждении ткани трансплантата, тем самым подтверждая статус HLA-DR $^+$ Т-клеток в качестве ключевых эффекторов в реакции отторжения [13].

Ряд исследований подтверждает, что дисбаланс в соотношении $CD4^+/CD8^+$ Т-лимфоцитов является важным маркером иммунной дисрегуляции и тесно связан с повышенным риском отторжения трансплантата [13, 14].

У пациентов в подгруппе 1a нами выявлено снижение соотношения $CD4^+/CD8^+$ менее 1,0 на $10^9/л$, что наблюдается в случае преобладания $CD8^+$ Т-клеток, которые играют ведущую роль в отторжении клеток трансплантата.

Кроме того, зафиксированное значимое увеличение количества Т-регуляторных клеток (Treg, фенотип $CD45R0^+CD3^+CD4^+CD25^+CD127^-$) у лиц этой же подгруппы может свидетельствовать о необходимости ограничения избыточного иммунного реагирования в отношении аллоткани. Именно Т-регуляторные клетки представляют собой специализированную субпопуляцию $CD4^+$ Т-клеток, способную подавлять активацию и пролиферацию эффекторных Т-клеток (Th1, Th17, $CD8^+$ Т-клеток) через различные механизмы, включая секрецию иммуносупрессивных цитокинов ($TGF-\beta$, IL-10), прямую клеточную ингибицию и конкуренцию за IL-2 [4].

Примечательно, что проведенное нами исследование не выявило существенных различий в числе ТНК- и НК-клеток среди исследуемых групп пациентов, что позволяет сделать предположение о незначительном вкладе данной популяции иммуноцитов в патогенез отторжения роговичного трансплантата после пересадки. Об этом убедительно свидетельствуют данные других исследований, показывающие более высокую активность НК-клеток в реакциях отторжения при пересадке твердых органов, например, почек или печени, чем при трансплантации роговицы [7, 10].

Кроме того, не выявлено значительных колебаний уровня В-лимфоцитов у пациентов разных групп в позднем послеоперационном периоде, где преобладают клеточные иммунные реакции. Известно, что гуморальные факторы чаще опосредуют развитие ранних (острых и сверхострых) антителозависимых реакций гиперчувствительности немедленного типа, обусловленных наличием антител против аллоантигенов трансплантата, включая молекулы МНС класса I и II, а также не-HLA антигены. Антитела способны вызывать повреждение эндотелия трансплантата посредством включения механизмов комплемент-зависимой цитотоксичности, а также путем опсонизации нейтрофилов и макрофагов с последующим развитием воспалительных изменений в тканях роговичного ложа [6, 10].

Выводы

1. Проведенный анализ выявил значимое увеличение общего количества Т-лимфоцитов, Т-хелперов, Т-цитотоксических клеток, Т-лимфоцитов с маркерами ранней и поздней активации у пациентов с реакцией отторжения трансплантата. Т-лимфоциты выступают основными эффекторными клетками адаптивного иммунитета, распознающими чужеродные антигены аллотрансплантата через взаимодействие с молекулами главного комплекса гистосовместимости с последующим запуском реакций иммунного реагирования, а также прямое повреждение клеток трансплантата за счет цитотоксических механизмов.

2. Изменения в клеточном иммунном составе периферической крови демонстрируют системный характер реакции отторжения нативного аллотрансплантата роговицы и диктуют необходимость углубленного изучения Т-клеточного ответа для понимания патогенеза поздних клеточных реакций.

3. Цитометрический анализ позволяет выявлять ранние признаки иммунной активации, связанной с отторжением, что открывает новые возможности для разработки персонализированных подходов в терапии.

Список литературы / References

1. Зурочка А.В., Хайдуков С.В., Кудрявцев И.В., Черешнев В.А. Проточная цитометрия в биомедицинских исследованиях. Екатеринбург: РИО УрО РАН, 2018. 720 с. [Zurochka A.V., Khaidukov S.V., Kudryavtsev I.V., Chereshev V.A. Flow cytometry in biomedical research]. Ekaterinburg: RIO, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, 2018. 720 p.
2. Мороз З.И. Кератопластика и кератопротезирование. В: Аветисов С.Э., Егоров Е.А., Мошетьова Л.К., Нероев В.В., Тахчиди Х.П. (ред.). Офтальмология: национальное руководство. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2008. С. 472-474. [Moroz Z.I. Keratoplasty and keratoprosthetics. In: Avetisov S.E., Egorov E.A., Moshetova L.K., Neroev V.V., Takhchidi Kh.P. (eds.). Ophthalmology: National Guidelines]. Moscow: GEOTAR-Media, 2008, pp. 472-474.
3. Alio J.L., Montesel A., El Sayyad F., Barraquer R.I., Arnalich-Montiel F., Del Barrio J.L.A. Corneal graft failure: an update. *Br. J. Ophthalmol.*, 2021, Vol. 105, no. 8, pp. 1049-1058.
4. Avunduk A.M., Avunduk M.C., Tekelioğlu Y., Kapıcıoğlu Z. CD4⁺ T cell/CD8⁺ T cell ratio in the anterior chamber of the eye after penetrating injury and its comparison with normal aqueous samples. *Jpn. J. Ophthalmol.*, 1998, Vol. 42, no. 3, pp. 204-207.
5. Boiségaud F., Liu Y., Anosova N., Ehrlich E., Dana M.R., Benichou G. Role of CD4⁺ and CD8⁺ T cells in allorecognition: lessons from corneal transplantation. *J. Immunol.*, 2001, Vol. 167, no. 4, pp. 1891-1899.
6. Chi H., Wei C., Ma L., Yu Y., Zhang T., Shi W. The ocular immunological alterations in the process of high-risk corneal transplantation rejection. *Exp. Eye Res.*, 2024, Vol. 245, 109971. doi: 10.1016/j.exer.2024.109971.
7. Maharana P.K., Mandal S., Kaweri L., Sahay P., Lata S., Asif M.I., Sharma N. Immunopathogenesis of corneal graft rejection. *Indian J. Ophthalmol.*, 2023, Vol. 71, no. 5, pp. 1733-1738.
8. Mandal S., Maharana P.K., Kaweri L., Asif M.I., Nagpal R., Sharma N. Management and prevention of corneal graft rejection. *Indian J. Ophthalmol.*, 2023, Vol. 71, no. 9, pp. 3149-3159.

9. Owen D.L., Mahmud S.A., Vang K.B., Kelly R.M., Blazar B.R., Smith K.A., Farrar M.A. Identification of cellular sources of IL-2 needed for regulatory T cell development and homeostasis. *J. Immunol.*, 2018, Vol. 200, no. 12, pp. 3926-3933
10. Sakowska J., Glasner P., Dukat-Mazurek A., Rydz A., Zieliński M., Pellowska I., Trzonkowski P. Local T cell infiltrates are predominantly associated with corneal allograft rejection. *Transpl. Immunol.*, 2023, Vol. 79, 101852. doi: 10.1016/j.trim.2023.101852.
11. Scarabosio A., Surico P.L., Tereshenko V., Singh R.B., Salati C., Spadea L., Zeppieri M. Whole-eye transplantation: Current challenges and future perspectives. *World J. Transplant.*, 2024, Vol. 14, no. 2, 95009. doi: 10.5500/wjt.v14.i2.95009.
12. Vabres B., Pleyer U., Hjortdal J., Murphy C.C., Armitage W.J., Imrie L., Degauque N. Corneal graft rejection: is it reflected in peripheral immune cells? Results of a prospective multicenter study (VISICORT). *Transplantation*, 2025, Vol. 109, no. 5, pp. 794-805.
13. Völker-Dieben H.J., Claas F.H., Schreuder G.M.T., Schipper R.F., Pels E., Persijn G.G., D'Amato J. Beneficial effect of HLA-DR matching on the survival of corneal Allografts. *Transplantation*, 2000, Vol. 70, no. 4, pp. 640-648.
14. Yin J. Advances in corneal graft rejection. *Curr. Opin. Ophthalmol.*, 2021, Vol. 32, no. 4, pp. 331-337.
15. Zhu J., Inomata T., Di Zazzo A., Kitazawa K., Okumura Y., Coassin M., Murakami A. Role of immune cell diversity and heterogeneity in corneal graft survival: A systematic review and meta-analysis. *J. Clin. Med.*, 2021, Vol. 10, no. 20, 4667. doi: 10.3390/jcm10204667.

Авторы:

Кузнецов А.А. — к.м.н., заведующий офтальмологическим центром ГБУЗ «Челябинская областная клиническая больница», г. Челябинск, Россия

Быстров А.М. — врач офтальмологического отделения № 1 ГБУЗ «Челябинская областная клиническая больница»; старший лаборант кафедры медицинской реабилитации и спортивной медицины ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Челябинск, Россия

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

Authors:

Kuznetsov A.A., PhD (Medicine), Head, Ophthalmology Center, Chelyabinsk Regional Clinical Hospital, Chelyabinsk, Russian Federation

Bystrov A.M., Clinical Doctor, Ophthalmology Department No. 1, Chelyabinsk Regional Clinical Hospital; Senior Laboratory Assistant, Medical Rehabilitation Department, South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

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

Черешнева М.В. — д.м.н., профессор, заслуженный деятель науки РФ, главный научный сотрудник лаборатории иммунофизиологии и иммунофармакологии ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук, г. Екатеринбург, Россия

Гаврилова Т.В. — д.м.н., профессор, член-корр. РАН, заведующая кафедрой офтальмологии ФГБОУ ВО «Пермский государственный медицинский университет имени академика Е.А. Вагнера» Министерства здравоохранения РФ, г. Пермь, Россия

Chereshneva M.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Honored Scientist of the Russian Federation, Chief Researcher, Laboratory of Immunophysiology and Immunopharmacology, Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, Russian Federation

Gavrilova T.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Corresponding Member, Russian Academy of Sciences, Head, Department of Ophthalmology, E. Wagner Perm State Medical University, Perm, Russian Federation

Поступила 18.03.2025

Отправлена на доработку 08.05.2025

Принята к печати 25.05.2025

Received 18.03.2025

Revision received 08.05.2025

Accepted 25.05.2025

ОЦЕНКА ДИНАМИКИ УРОВНЯ ПРОДУКЦИИ IL-1 β , TNF α И IL-10 ПРИ ВЕСТИБУЛОПЛАСТИКЕ СКАЛЬПЕЛЕМ И ЛАЗЕРОМ В ОБЛАСТИ ДЕНТАЛЬНЫХ ИМПЛАНТАТОВ

Свитич О.А.^{1,2}, Калинин С.А.², Тарасенко С.В.², Быстрицкая Е.П.¹

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

² ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ (Сеченовский Университет), Москва, Россия

Резюме. Для долгосрочной выживаемости имплантатов необходим как стабильный уровень костной ткани, так и оптимальная ширина прикрепленной кератинизированной слизистой оболочки, выполняющей буферную и защитную функции в отношении пищевого комка. Дефицит кератинизированной слизистой оболочки может вызывать биологические осложнения имплантации, приводящие к дезинтеграции имплантатов. Потенциальными биомаркерами для диагностики заболеваний и/или оценки эффективности применяемого лечения в стоматологической практике являются цитокины. Цитокины слюны связаны с воспалением полости рта, что делает их потенциальными биомаркерами для диагностики заболеваний и/или оценки эффективности применяемого лечения в стоматологической практике. Благодаря простоте сбора образцов слюны, определение цитокинов в ней может стать полезным и широко распространенным методом контроля течения послеоперационного периода в условиях проводимых хирургических манипуляций. В нашем исследовании мы сопоставим клиническую картину течения послеоперационного периода и уровень IL-10, IL-1 β и TNF α при заживлении слизистой оболочки после проведения вестибулопластики в области дентальных имплантатов различными инструментами альтерации — скальпелем и лазером. Цель — провести оценку уровня белковой продукции цитокинов IL-1 β , TNF α и IL-10 в супернатанте смешанной слюны и степень выраженности боли и коллатерального отека в динамике заживления раневого дефекта у пациентов, которым была проведена вестибулопластика в области интегрированных дентальных имплантатов скальпелем и лазером. 16 пациентов с дефицитом прикрепленной кератинизированной слизистой оболочки, которым была проведена вестибулопластика в области интегрированных дентальных имплантатов. На 1-е, 2-е, 3-и, 5-е и 7-е сутки после операции производили измерение выраженности боли и коллатерального отека, а также измерение цитокинового профиля (IL-10, IL-1 β и TNF α) в

Адрес для переписки:

Калинин Сергей Алексеевич
Институт стоматологии имени Е.В. Боровского
119048, Россия, Москва, ул. Можайский вал, 11.
Тел.: 8 (909) 630-98-18.
E-mail: medikas97@mail.ru

Address for correspondence:

Sergey A. Kalinin
E. Borovsky Institute of Dentistry
11 Mozhaisky Val St
Moscow
119048 Russian Federation
Phone: +7 (909) 630-98-18.
E-mail: medikas97@mail.ru

Образец цитирования:

О.А. Свитич, С.А. Калинин, С.В. Тарасенко, Е.П. Быстрицкая «Оценка динамики уровня продукции IL-1 β , TNF α и IL-10 при вестибулопластике скальпелем и лазером в области дентальных имплантатов» // Российский иммунологический журнал, 2025. Т. 28, № 3. С. 847-854.
doi: 10.46235/1028-7221-17194-DOI

© Свитич О.А. и соавт., 2025

Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

O.A. Svitich, S.A. Kalinin, S.V. Tarasenko, E.P. Bystritskaya "Dynamics of IL-1 β , TNF α and IL-10 production during vestibuloplasty with lancet surgery or laser technique in the area of dental implants", Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2025, Vol. 28, no. 3, pp. 847-854.
doi: 10.46235/1028-7221-17194-DOI

© Svitich O.A. et al., 2025

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

DOI: 10.46235/1028-7221-17194-DOI

динамике заживления раневого дефекта. При попарном сравнении показателей (уровень боли, выраженность коллатерального отека и уровень IL-1 β) на 3-и сутки после операции выявлены статистически значимые различия. Провоспалительные цитокины, детектируемые в слюне, могут выступать в качестве прогностических маркеров и позволят создать новый персонализированный подход к ведению пациентов стоматологического профиля. Принимая во внимание все параметры оценки способов хирургического вмешательства, при выполнении вестибулопластики целесообразнее проведение манипуляций с применением лазерных технологий.

Ключевые слова: мукозальный иммунитет, провоспалительные цитокины, вестибулопластика, лазер, прикрепленная кератинизированная слизистая оболочка, дентальные имплантаты

DYNAMICS OF IL-1 β , TNF α AND IL-10 PRODUCTION DURING VESTIBULOPLASTY WITH LANCET SURGERY OR LASER TECHNIQUE IN THE AREA OF DENTAL IMPLANTS

Svitich O.A.^{a, b}, Kalinin S.A.^b, Tarasenko S.V.^b, Bystrietskaya E.P.^a

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

^b I. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation

Abstract. Long-term survival of implants requires both a stable bone level and an optimal width of attached keratinized mucosa, which acts as a buffer and protector against the food bolus. Deficiency of keratinized mucosa may cause biological complications of implantation, leading to implant disintegration. Cytokines are potential biomarkers for diagnostics of various disorders and/or assessment of treatment effectiveness in dental practice. Salivary cytokines are associated with oral inflammation, making them potential diagnostic biomarkers. Due to simple collection of salivary samples, cytokine determination in saliva may become a useful and widely used method for monitoring the course of the postoperative period in the context of surgery. In our study, we compare the clinical features of the postoperative period and the levels of IL-10, IL-1 β and TNF α during the healing of the mucous membrane after vestibuloplasty in the area of dental implants with various instruments, i.e., surgical lancet and a laser. Our objective was to evaluate the level of IL-1 β , TNF α and IL-10 cytokines in the supernatant of mixed saliva, severity of pain and collateral edema in the course of wound defect healing in patients who underwent vestibuloplasty in the area of integrated dental implants with a scalpel or laser technique. We observed 16 patients with a deficiency of attached keratinized mucous membrane who underwent vestibuloplasty in the area of integrated dental implants. On days 1, 2, 3, 5 and 7 after surgery, the severity of pain and collateral edema were evaluated, as well as cytokine profile (IL-10, IL-1 β and TNF α) in the time course of wound healing. Pairwise comparisons of clinical parameters (pain level, severity of collateral edema and IL-1 β level) have revealed statistically significant differences on day 3 after surgery. Proinflammatory cytokines detected in saliva can act as prognostic markers and will allow the development of a new personalized approach to the management of dental patients. Taking into account all the parameters for assessing different surgical methods, it seems advisable to perform manipulations using laser technologies when performing vestibuloplasty surgery.

Keywords: mucosal immunity, proinflammatory cytokines, vestibuloplasty, laser, attached keratinized mucosa, dental implants

Введение

Для долгосрочной выживаемости дентальных имплантатов необходим не только стабильный уровень костной ткани, но и оптимальная ширина прикрепленной кератинизированной слизистой оболочки, так как ее дефицит может вызывать биологические осложнения имплантации,

приводящие к дезинтеграции имплантатов [2]. Поэтому представляет интерес иммунологическое обоснование оперативных вмешательств по поводу менеджмента мягких тканей в области несъемных ортопедических конструкций различными инструментами альтерации для поиска наиболее щадящих методов лечения [4].

Заживление ран является сложным процессом, состоящим из трех последовательных стадий: воспаление, пролиферация клеток и ремоделирование тканей. Воспаление сопровождается гемостазом, во время которого образуется «матрица» будущей ткани — фибриновый тромб. Циркулирующие иммунные клетки (нейтрофилы, макрофаги, моноциты, тучные клетки и регуляторные Т-клетки) проникают в этот матрикс, удаляют омертвевшие ткани и элиминируют из тканей инфекционные агенты. В стадии пролиферации рекрутируются фибробласты, которые выделяют коллаген и образуют грануляционную ткань, внутри которой происходит процесс ангиогенеза и созревания клеток. Этап пролиферации сопровождается эпителизацией раны [5].

Одними из факторов гуморального иммунитета, участвующих в контроле течения воспалительного процесса, являются цитокины. Эти эффекторные молекулы опосредуют межклеточную коммуникацию при воспалении, иммунных процессах, кроветворении, эпителизации дефектов; они также способны регулировать силу и длительность иммунного ответа [6].

Данные последних исследований свидетельствуют о том, что цитокины, в том числе детектируемые в слюне, могут позволить оценить не только течение системных заболеваний, но и состояние полости рта [7].

Согласно работам А.В. Гуськова и соавт. (2023), С.В. Чуйкина и соавт. (2022) и др., ключевыми про- и противовоспалительными цитокинами при оперативных вмешательствах в челюстно-лицевой области, которые влияют на процесс заживления раневого дефекта и рубцевание тканей, являются IL-1 β , IL-10 и TNF α [3, 8, 9].

Цитокины слюны связаны с воспалением полости рта, что делает их потенциальными биомаркерами для диагностики заболеваний и/или оценки эффективности применяемого лечения в стоматологической практике [10]. Благодаря простоте сбора образцов слюны, определение цитокинов в ней может стать полезным и широко распространенным методом контроля течения послеоперационного периода в условиях проводимых хирургических манипуляций [11].

В нашем исследовании мы сопоставим клиническую картину течения послеоперационного периода и уровень IL-10, IL-1 β и TNF α при заживлении слизистой оболочки после проведения вестибулопластики в области дентальных имплантатов различными инструментами альтерации — скальпелем и лазером.

Цель — провести оценку уровня белковой продукции цитокинов IL-1 β , TNF α и IL-10 в супернатанте смешанной слюны и степень выраженности боли и коллатерального отека в динамике

заживления раневого дефекта у пациентов, которым была проведена вестибулопластика скальпелем и лазером.

Материалы и методы

На кафедре хирургической стоматологии Института стоматологии им. Е.В. Боровского было прооперировано 16 пациентов, у которых, согласно критериям включения, была выявлена ширина зоны прикрепленной кератинизированной слизистой оболочки в области дентальных имплантатов менее 2 мм.

Средний возраст пациентов группы контроля составил $39,4 \pm 7,63$ года, средний возраст пациентов группы сравнения — $46,2 \pm 9,39$ года, 8 мужчин (50%) и 8 женщин (50%). Все пациенты были сопоставимы по полу и возрасту и имели одинаковую возможность получить хирургическое лечение как с применением скальпеля, так и с применением лазерных технологий (контрольная группа — скальпель, $n = 10$; группа сравнения — лазер, $n = 6$). Было проведено проспективное, нерандомизированное, продольное, одноцентровое исследование в параллельных группах. Данная публикация является оригинальным исследованием в рамках диссертации на соискание ученой степени кандидата медицинских наук, на которое выдано заключение локальным этическим комитетом Сеченовского Университета № 28-24 от 21.11.2024.

Для оценки выраженности болевого синдрома на 1-е, 3-и, 5-е и 7-е сутки использовали десятибалльную визуально-аналоговую шкалу боли (ВАШ, Visual Analog Scale, VAS), где интенсивность боли выражена в баллах от 0 до 10 (0 баллов — боль отсутствует, 10 баллов — непереносимая боль). Интенсивность коллатерального отека мягких тканей оценивали на 1-е, 3-и и 5-е сутки с применением балльной системы, предложенной М. Tonetti и соавт. (2023), где 0 — отсутствие отека, 1 — незначительный отек, 2 — умеренный отек, 3 — выраженный отек [15].

Ход операции: вестибулопластика скальпелем проводилась по стандартной методике Irving Glickman. Лазерная операция проводилась диодным лазером Doctor Smile Simpler с длиной волны 980 нм (Lambda SpA, Италия) на всех этапах. Особенность оперативного вмешательства заключалась в том, что забор трансплантата с области неба также проводился лазерным лучом в импульсно-периодическом режиме мощностью 1,2 Вт.

Для определения белковой продукции про- и противовоспалительных цитокинов (IL-1 β , TNF α и IL-10) методом иммуноферментного анализа производили забор образцов нестимулированной смешанной слюны. Образцы заби-

рали до оперативного вмешательства, а также в период осмотров на 1-е, 2-е, 3-и, 5-е и 7-е сутки в течение 5 минут путем сплевывания в пластиковый эппендорф (Yancheng Huida Medical, Китай). Образцы хранили при температуре минус 70 °С. После однократного размораживания образцы центрифугировали и отделяли надосадочную жидкость (супернатант) по методу Вавиловой Т.П. [1]. Стандартизацию образцов слюны проводили по общему белку в пробе. Концентрацию белка определяли на спектрофотометре (NanoDrop 2000, Thermo Fisher, США) до проведения экспериментального исследования. Количественное определение уровня IL-1 β , IL-10, TNF α в супернатанте смешанной слюны проводили твердофазным иммуноферментным методом с помощью тест-системы АО «Вектор-Бест» (Россия) согласно прилагаемой инструкции. Данные представлены в виде пг анализа на мг общего белка.

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью компьютерной программы STATISTICA 11.0 (StatSoft Inc., США). Были определены: максимальное, минимальное и среднее значения показателей, стандартное отклонение, медиана, интерквартильные размахи.

После проверки нормальности распределения выборки, сравнение показателей боли и коллатерального отека производили с помощью параметрического показателя Т-критерий Стьюдента. Сравнение экспрессии про- и противовоспалительных цитокинов между двумя группами производили с помощью непараметрических критериев Манна–Уитни и Краскела–Уоллиса. Результаты считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Снижение дискомфорта пациентов в период реабилитации и отсутствие боли в области оперативного вмешательства способствует более быстрому возвращению пациентов к трудовой деятельности. Для сокращения сроков послеоперационного восстановления, ключевым фактором которого является выраженность болевого синдрома, должны совершенствоваться методики хирургических манипуляций и применяться новые инструменты альтерации.

У группы пациентов, прооперированных скальпелем, пик боли соответствовал 1-м суткам после оперативного вмешательства, с плавным снижением на 7-е сутки. У группы пациентов, прооперированных лазером, пик боли приходился на 2-е сутки после оперативного вмешательства с резким снижением на 3-и сутки. К 7-м суткам болевая симптоматика отсутствовала полностью.

При попарном сравнении на каждом сроке уровня боли пациентов у группы контроля и сравнения по Т-критерию для независимых выборок выявлено статистически значимые различия на 3-и сутки ($p < 0,035844$) и 7-е сутки ($p < 0,041209$), что свидетельствует о более комфортном течении послеоперационного периода и сокращении сроков реабилитации пациентов (до 5 дней) при использовании лазера в качестве инструмента альтерации.

Степень травматичности воздействия инструмента на мягкие ткани положительно коррелирует с выраженностью воспалительной симптоматики (коллатерального отека).

При попарном сравнении уровня коллатерального отека у пациентов обеих групп на каждом сроке по Т-критерию для независимых выборок, выявлено статистически значимые различия на 3-и сутки ($p < 0,048072$) результат значим при $p < 0,05$.

Далее в работе проводился анализ цитокинового профиля слюны, который позволил оценить характер течения оперативного вмешательства, прогнозировать его исход, оценить эффективность и безопасность хирургического лечения.

В работе было проведено исследование уровня цитокинов IL-1 β , так как, согласно литературным источникам, данный провоспалительный цитокин обеспечивает антимикробные функции нейтрофилов, ускоряет элиминацию патогенной микрофлоры из раны, способствует высвобождению оксида азота и матриксных металлопротеиназ из тканей, индуцирует фибробласты к секреции кератиноцитарного фактора роста, фактора роста фибробластов-7 (FGF-7), IL-6, гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF) и гепатоцитарного фактора роста, а следовательно, влияет на заживления раневого дефекта, рубцевание тканей и выраженность болевой симптоматики в послеоперационном периоде [12].

Динамика показателей уровня IL-1 β по суткам у пациентов группы контроля и сравнения представлены на рисунке 1.

При попарном сравнении различных подходов (скальпель и лазер) для IL-1 β на 3-и сутки после оперативного вмешательства показано достоверное различие. Так, на 3-и сутки для пациентов группы контроля минимальное значение IL-1 β составило 2,956 пг/мг, максимальное — 371,4 пг/мг, медиана — 56,22 пг/мг. Для пациентов группы сравнения минимальное значение составило — 0,4050 пг/мг, максимальное — 25,67 пг/мг, медиана — 16,32 пг/мг. Полученные данные коррелируют с высокой оценкой на 3-и сутки уровня боли и коллатерального отека у группы пациен-

тов, получившей лечение классическим инструментом альтерации — скальпелем.

TNF α , обладая провоспалительным действием, уменьшает количество коллагена, гидрокси-пролина и грануляционной ткани в ранах, приводя к нарушению их заживления и при высоком уровне индуцирует эпителиально-мезенхимальный переход в клетках, инициируя фиброзное состояние. В нашем исследовании на 3-и сутки для пациентов группы контроля минимальное значение TNF α составило 4,814 пг/мг, максимальное — 90,76 пг/мг, медиана — 11,31 пг/мг. Для пациентов группы сравнения минимальное значение составило 14,02 пг/мг, максимальное — 83,60 пг/мг, медиана — 20,89 пг/мг.

Полученные данные противоречат литературным источникам (М. Kramer и соавт., 2009; Р. Morris и соавт., 2020), согласно которым TNF α сенсибилизируют первичные афферентные ноцицепторы, тем самым повышая болевую симптоматику в послеоперационном периоде, однако, как было сказано выше, у пациентов, вестибулопластика которым была проведена лазером, на эти сутки болевой синдрома выражен менее ярко, чем у пациентов группы контроля с классическим инструментом альтерации [13, 14].

Основным цитокином, приводящим к прекращению воспалительного иммунного ответа, как непосредственно путем подавления активности макрофагов и дендритных клеток, так и косвенно, ограничивая активацию, дифференцировку и эффекторную функцию Т-клеток и способствуя периферической толерантности, является IL-10. В ранах кожных покровов IL-10 способствует регенеративному восстановлению тканей за счет STAT3-зависимой регуляции синтеза гиалурона, специфичного для фибробластов, рекрутирует эндотелиальные клетки-предшественники (ЕРС), приводит к увеличению сосудистых структур и более быстрой реэпителизации, позволяя развиваться физиологически нормальной ткани без избыточного фиброза [16]. Динамика изменения показателей IL-10 у пациентов группы контроля и сравнения представлены на рисунке 2.

У пациентов группы контроля отмечали резкое снижение уровня противовоспалительного цитокина IL-10 к 3-м суткам после оперативного вмешательства, а у пациентов группы сравнения (лазер) отмечали плавное изменение показателей уровня цитокина к 7-м суткам. Полученные результаты сопоставимы с приведенными выше клиническими показателями боли и коллатерального отека и свидетельствуют о выраженном иммуномодулирующем воздействии лазерного излучения.

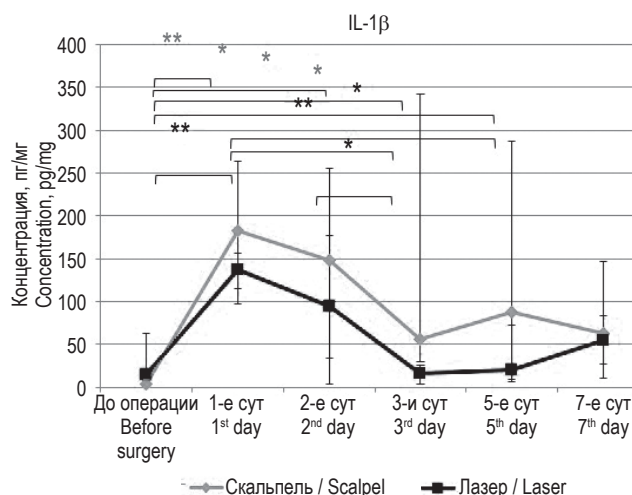


Рисунок 1. Динамика показателей уровня IL-1β по суткам у пациентов группы контроля (скальпель) и сравнения (лазер)

Примечание. Данные представлены в виде медианных значений концентраций (в пг аналита на 1 мг общего белка в пробе). Синими звездочками указаны достоверные отличия для группы «скальпель», красными – для группы «лазер». * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$.

Figure 1. Dynamics of IL-1 β levels by day in patients of the control (scalpel) and comparison (laser) groups

Note. The data are presented as median concentration values in pg of analyte per 1 mg of total protein in the sample). Blue asterisks indicate significant differences for the scalpel group, red ones – for the laser group. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$.

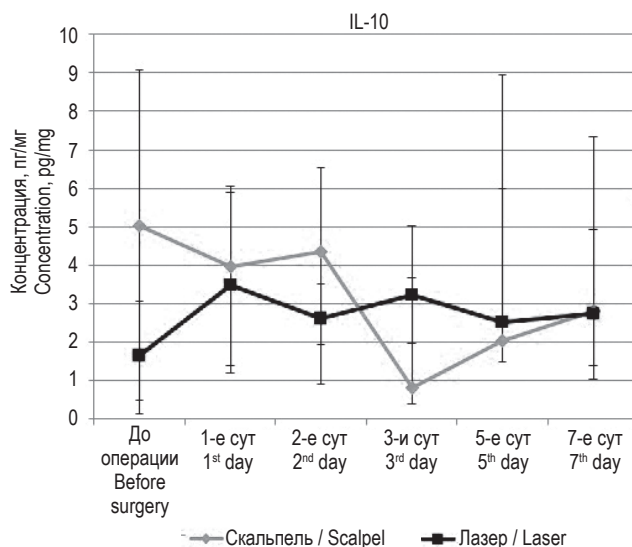


Рисунок 2. Динамика показателей уровня IL-10 по суткам у пациентов группы контроля (скальпель) и сравнения (лазер)

Примечание. Данные представлены в виде медианных значений концентраций (в пг аналита на 1 мг общего белка в пробе).

Figure 2. Dynamics of IL-10 level indicators by day in patients of the control (scalpel) and comparison (laser) groups

Note. The data are presented as median concentration values in pg of analyte per 1 mg of total protein in the sample).

Выводы

Провоспалительные цитокины, детектируемые в слюне, могут выступать в качестве маркеров, свидетельствующих о течении послеоперационного периода, и позволят создать новый персонализированный прогностический подход к ведению пациентов стоматологического профиля. Принимая во внимание все параметры

оценки способов хирургического вмешательства: достоверно значимые различия в уровне боли на 3-и ($p < 0,035844$) и 5-е ($p < 0,041209$) сутки, коллатерального отека на 3-и сутки ($p < 0,048072$), уровня IL-1 β на 3-и сутки (медиана для пациентов группы скальпеля — 56,22 пг/мг, для группы лазера — 16,32 пг/мг), при выполнении вестибулопластики целесообразнее проведение манипуляций с применением лазерных технологий.

Список литературы / References

1. Вавилова Т.П., Янушевич О.О., Островская И.Г. Аналитические возможности и перспективы. Слюна. М.: БИНОМ, 2014. С. 94-156. [Vavilova T.P., Yanushevich O.O., Ostrovskaya I.G. Analytical Opportunities and Prospects. *Saliva*. M.: BINOM Publishing House. 2014. P. 94-156. (In Russ.)]
2. Ганковская Л.В., Хелминская Н.М., Молчанова Е.А., Свитич О.А. Роль факторов врожденного иммунитета в патогенезе пародонтита // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии, 2016. Т. 93, № 2. С. 100-107. [Gankovskaya L.V., Khelminskaya N.M., Molchanova E.A., Svitich O.A. Role of innate immunity factors in periodontitis pathogenesis. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2016, Vol. 93, no. 2, pp. 100-107. (In Russ.)]
3. Гуськов А.В., Олейников А.А., Никифоров А.А., Логункова В.Г., Жуковец Д.Г., Лаут О.А. Влияние факторов системного воспаления и дисфункции эндотелия при общесоматических патологиях на успешность дентальной имплантации (обзор литературы) // Прикладные информационные аспекты медицины, 2023. Т. 26, № 3. С. 73-84. [Guskov A.V., Oleynikov A.A., Nikiforov A.A., Logunkova V.G., Zhukovets D.G., Laut O.A. Influence of factors of systemic inflammation and endothelial dysfunction in somatic pathologies on the success of dental implantation (literature review). *Prikladnyye informatsionnyye aspekty meditsiny = Applied Information Aspects of Medicine*, 2023, Vol. 26, no. 3, pp. 73-84. (In Russ.)]
4. Ерокина Н.Л., Лепилин А.В., Миронов А.Ю., Захарова Н.Б., Фищев С.Б. Роль цитокинов, хемокинов и факторов роста в заживлении лунок удаленных зубов // Пародонтология, 2021. Т. 26, № 1. С. 58-63. [Erokina N.L., Lepilin A.V., Mironov A.Y., Zakharova N.B., Fishtchev S.B. The role of cytokines, chemokines and growth factors in extraction socket healing. *Parodontologiya = Parodontology*, 2021, Vol. 26, no. 1, pp. 58-63. (In Russ.)]
5. Инжуватова К.П., Гуйтер О.С. Анализ взаимосвязи количественных показателей различных цитокинов в ротовой жидкости и местного воспалительного процесса на этапе ортопедической реабилитации пациентов с послеоперационными дефектами челюстей // Голова и шея, 2022. Т. 10, № 4. С. 68-74. [Inzuvatova K.P., Guyter O.S. Analysis of the interconnection between the quantitative indicators of various cytokines in the oral fluid and the local inflammatory process at the stage of orthopedic rehabilitation of patients with postoperative jaw defects. *Golova i sheya = Head and Neck*, 2022, Vol. 10, no. 4, pp. 68-74. (In Russ.)]
6. Контомиров К.Д., Зимовская А.С., Рогова С.С., Рымар Н.М., Полещук Т.С. Влияние биохимических факторов на долговечность зубных имплантатов и важность их учета при остеоинтеграции // Проблемы стоматологии, 2024. Т. 20, № 2. С. 40-45. [Kontomirov K.D., Zimovskaya A.S., Rogova S.S., Rymar N.M., Poleshchuk T.S. Influence of biochemical factors on the durability of dental implants and the importance of considering them during osseointegration. *Problemy stomatologii = Actual Problems in Dentistry*, 2024, Vol. 20, no. 2, pp. 40-45. (In Russ.)]
7. Порожский С.В., Македонова Ю.А., Адамович Е.И., Марымова Е.Б. Экспериментальное изучение динамики регенерации слизистой полости рта на фоне различных методов фармакотерапии // Современные проблемы науки и образования, 2018. № 4. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=27726>. [Porojskij S.V., Makedonova Yu.A., Adamovich E.I., Marymova E.B. Experimental study of the dynamics of regeneration of the oral mucosa against the background of various methods of pharmacotherapy. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya = Modern Problems of Science and Education*, 2018, no. 4. [Electronic resource]. Available at: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=27726>. (In Russ.)]
8. Чуйкин О.С., Билак А.Г., Кучук К.Н., Давлетшин Н.А., Дюмеев Р.М., Акатъева Г.Г., Макушева Н.В. Изучение иммунологических, физико-химических и биохимических показателей ротовой жидкости у детей с врожденной расщелиной неба // Проблемы стоматологии, 2024. Т. 20, № 2. С. 163-167. [Chuykin O.S., Bilak A.G., Kuchuk K.N., Davletshin N.A., Dyumeev R.M., Akat'yeva G.G., Makusheva N.V. Immunological,

physico-chemical and biochemical parameters of oral fluid in children with congenital cleft palate and postoperative palate defect. *Problemy stomatologii = Actual Problems in Dentistry*, 2024, Vol. 22, no. 2, pp. 163-167. (In Russ.)]

9. Шестель И.В., Пикиреня И.И. Иммуногистохимические маркеры процессов репаративной регенерации кожных ран // Хирургия. Восточная Европа, 2023. Т. 12, № 1. С. 102-113. [Shestel I.V., Pikirenya I.I. Immunohistochemical markers of reparative regeneration of skin wounds. *Hirurgiya. Vostochnaya Evropa = Surgery. Eastern Europe*, Vol. 12, no. 1, pp. 102-113. (In Russ.)]

10. Breunig N., Stiller M., Mogk M., Mengel R. Influence of gingival phenotype on crestal bone loss at implants. *Int. J. Implant Dent.*, 2024, Vol. 10, no. 1, 39. doi: 10.1186/s40729-024-00531-4.

11. Carlini V., Noonan D.M., Abdalalem 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.

12. Diesch T., Filippi C., Fritschi N., Filippi A., Ritz N. Cytokines in saliva as biomarkers of oral and systemic oncological or infectious diseases: A systematic review. *Cytokine*, 2021, Vol. 143, 155506. doi: 10.1016/j.cyt.2021.155506.

13. Kramer P.R., Winger V., Reuben J. PI3K limits TNF- α production in CD16-activated monocytes. *Eur. J. Immunol.*, 2009, Vol. 39, pp. 561-570.

14. Morris P., Ali K., Merritt M., Pelletier J., Macedo L.G. A systematic review of the role of inflammatory biomarkers in acute, subacute and chronic non-specific low back pain. *BMC Musculoskelet. Disord.*, 2020, Vol. 21, no. 1, 142. doi: 10.1186/s12891-020-3154-3.

15. Tonetti M., Sanz M., Avila-Ortiz G., Berglundh T., Cairo F., Derks J., Figuero E., Graziani F., Guerra F., Heitz-Mayfield L., Jung R., Lai H., Needleman I., Papapanou P., Sailer I., Sanz-Sanchez I., Schwarz F., Shi J., Thoma D. Relevant domains, core outcome sets and measurements for implant dentistry clinical trials: The Implant Dentistry Core Outcome Set and Measurement (ID-COSM) international consensus report. *J. Clin. Periodontol.*, 2023, Vol. 50, Suppl. 25, pp. 5-21.

16. Xiao T., Yan Z., Xiao S., Xia Y. Proinflammatory cytokines regulate epidermal stem cells in wound epithelialization. *Stem. Cell Res. Ther.*, 2020, Vol. 11, no. 1, 232. doi: 10.1186/s13287-020-01755-y.

Авторы:

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

Калинин С.А. — аспирант кафедры хирургической стоматологии Института стоматологии имени Е.В. Боровского ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ (Сеченовский Университет), Москва, Россия

Authors:

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

Kalinin S.A., Postgraduate Student, Department of Surgical Dentistry, E. Borovsky Institute of Dentistry, I. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation

Тарасенко С.В. — д.м.н., профессор, заведующая кафедрой хирургической стоматологии Института стоматологии имени Е.В. Боровского ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ (Сеченовский Университет), Москва, Россия

Быстрицкая Е.П. — к.м.н., сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

Tarasenko S.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Surgical Dentistry, E. Borovsky Institute of Dentistry, I. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation

Bystritskaya E.P., PhD (Medicine), Employee, Laboratory of Molecular Immunology, I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

Поступила 29.03.2025
Принята к печати 08.04.2025

Received 29.03.2025
Accepted 08.04.2025

ВОСПАЛИТЕЛЬНЫЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ ЧЕЛЮСТНО-ЛИЦЕВОЙ ОБЛАСТИ И ПОЛОСТИ РТА НА ФОНЕ ИММУНОДЕФИЦИТОВ

Саркисян Н.Г.^{1,2}, Катаева Н.Н.¹, Демидов С.Д.³, Мкртчян И.Г.⁴,
Меликян А.Г.¹, Осипова И.М.¹

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

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

³ Стоматологическая клиника «Дента ОС», г. Екатеринбург, Россия

⁴ Поликлиника № 2, Центральная городская клиническая больница № 6, г. Екатеринбург, Россия

Резюме. Воспалительные заболевания челюстно-лицевой зоны и слизистой оболочки полости рта составляют большую часть комплекса симптомов, встречающихся у пациентов с иммунодефицитами. Цель исследования — оценить частоту встречаемости воспалительных заболеваний стоматологического профиля у пациентов с врожденными ошибками иммунитета. Исследуемая группа пациентов Свердловской областной клинической больницы № 1 и Областной детской клинической больницы (г. Екатеринбург) включала 64 человека с различными диагнозами первичных иммунодефицитов: комбинированные иммунодефициты, антительные дефекты, аутовоспалительные нарушения, дефекты фагоцитов, дефекты иммунной дисрегуляции, дефекты комплемента, не верифицированный диагноз с признаками иммунодефицитов. У всех пациентов проводился осмотр челюстно-лицевой области и слизистой оболочки полости рта. Выяснили, что лимфаденит челюстно-лицевой области, рецидивирующие стоматиты, язвы и хейлит характерны для всех исследуемых групп пациентов, кроме группы с дефектами комплемента. Наряду с этим, диагноз «кандидоз» выявлен в двух классификационных группах: у «комбинированных иммунодефицитов» (4,2% из подгруппы), «дефектов фагоцитов» (50% из подгруппы). Такая же частота встречаемости верхнечелюстного синусита: у пациентов с «антительными дефектами» (46% случаев из подгруппы), «аутовоспалительными нарушениями» (13% случаев из подгруппы) и абсцессов, флегмон челюстно-лицевой области: «аутовоспалительные нарушения» (13% случаев из подгруппы), «дефекты фагоцитов» (10% случаев из подгруппы). Самый высокий процент воспалительных стоматологических заболеваний у таких, как хейлит (36% из всей исследуемой группы), стоматит (33% из всей исследуемой группы) и лимфаденит ЧЛЮ (31% из всей исследуемой группы). У пациентов с «аутовоспалительными нарушениями» и «дефектами фагоцитов»

Адрес для переписки:

Катаева Наталья Николаевна
ФГБОУ ВО «Уральский государственный
медицинский университет»
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
Ekaterinburg
620026 Russian Federation
Phone: +7 (343) 214-85-11.
E-mail: kataeva.nn@mail.ru

Образец цитирования:

Н.Г. Саркисян, Н.Н. Катаева, С.Д. Демидов,
И.Г. Мкртчян, А.Г. Меликян, И.М. Осипова
«Воспалительные заболевания челюстно-лицевой
области и полости рта на фоне иммунодефицитов»
// Российский иммунологический журнал, 2025. Т. 28,
№ 3. С. 855-860.
doi: 10.46235/1028-7221-17111-IDO

© Саркисян Н.Г. и соавт., 2025
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

N.G. Sarkisyan, N.N. Kataeva, S.D. Demidov, I.G. Mkrtchyan,
A.H. Melikyan, I.M. Osipova "Inflammatory diseases of the
maxillofacial region and oral cavity in the patients with immune
deficiency", Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy
Immunologicheskii Zhurnal, 2025, Vol. 28, no. 3, pp. 855-860.
doi: 10.46235/1028-7221-17111-IDO

© Sarkisyan N.G. et al., 2025
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.46235/1028-7221-17111-IDO

был диагностирован максимальный «набор» исследуемых воспалительных заболеваний. При этом самое большое количество людей из этих групп (60% и 70% соответственно) имели рецидивирующие стоматиты и язвы. У единственного пациента с диагнозом «дефекты комплимента» стоматологические воспалительные заболевания не обнаружены. В ходе исследования установлены наиболее распространенные стоматологические проявления у пациентов с врожденными дефектами иммунитета, а именно лимфаденит челюстно-лицевой области, хейлит, стоматиты и язвы. Полученные данные могут служить основой для разработки диагностических критериев, направленных на раннее выявление иммунодефицитных состояний в стоматологической практике, что оптимизирует клиническую маршрутизацию пациентов.

Ключевые слова: первичные иммунодефициты, лимфаденит челюстно-лицевой области, стоматит, хейлит, кандидоз, синусит

INFLAMMATORY DISEASES OF THE MAXILLOFACIAL REGION AND ORAL CAVITY IN THE PATIENTS WITH IMMUNE DEFICIENCY

Sarkisyan N.G.^{a, b}, Kataeva N.N.^a, Demidov S.D.^c, Mkrtchan I.G.^d,
Melikyan A.H.^a, Osipova I.M.^a

^a Ural State Medical University, Ekaterinburg, Russian Federation

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

^c Dental Clinic "Denta OS", Ekaterinburg, Russian Federation

^d Polyclinic No. 2, Central City Clinical Hospital No. 6, Ekaterinburg, Russian Federation

Abstract. Inflammatory conditions of the maxillofacial area and oral mucosa are a dominating syndrome in patients with immunodeficiencies. The purpose of our study was to assess the incidence of inflammatory diseases of the dental system in patients with congenital immune deficiencies. The study group of patients observed at Sverdlovsk Regional Clinical Hospital No. 1 and Regional Children's Clinical Hospital (Yekaterinburg) included 64 persons with primary immunodeficiencies including combined immunodeficiencies, deficient antibody production, auto-inflammatory disorders, deficient phagocyte function, immune dysregulation conditions, complement deficiencies, and a case of non-specified immune deficiency. Lymphadenitis of the maxillofacial region, recurrent stomatitis, ulcers and cheilitis are characteristic of all the studied groups of patients, except for the group with complement deficiency. The diagnosis of candidiasis was identified in the two groups: classified as "combined immune deficiency" (4.2% from the subgroup), "phagocyte deficiency" (50% from the subgroup). The similar incidence of maxillary sinusitis was documented in the following patients: "antibody defects" (46% from the subgroup), "autoinflammatory disorders" (13% of cases); maxillofacial abscesses and phlegmons were diagnosed in "autoinflammatory disorders" (13%), "phagocyte defects" (10% from the subgroup). The highest percentage of inflammatory dental diseases, such as cheilitis (36% from the entire study group), stomatitis (33% from the entire study group), and maxillofacial lymphadenitis (31% from the entire study group), was registered. The maximum spectrum of the mentioned inflammatory diseases was diagnosed in patients with auto-inflammatory disorders and phagocyte defects. At the same time, the largest number of people from these groups (60% and 70%, respectively) suffered with recurrent stomatitis and ulcers. Inflammatory dental diseases were not detected in a single patient diagnosed with complement deficiency. The following common dental manifestations were identified in patients with congenital immune defects: lymphadenitis of maxillofacial region, cheilitis, stomatitis and ulcers. This data would be useful for proper patient routing.

Keywords: primary immunodeficiencies, lymphadenitis of the maxillofacial region, stomatitis, cheilitis, candidiasis, sinusitis

Введение

Разнообразие генетических вариантов врожденных ошибок иммунитета (ВОИ) порождает многообразие их фенотипических проявлений, каждый наследственный синдром представляет комплекс нарушений, которые затрагивают разные органы и системы [1, 2, 4, 5]. Проблемы патологии в полости рта при наследственных синдромах часто остаются в тени основной патологии. Подобное явление может объясняться невысокой осведомленностью специалистов узкого профиля о проблеме первичных иммунодефицитов. Стоматологические проявления на фоне ВОИ требуют специфичных знаний, способствующих диагностике основного заболевания иммунной системы [6].

Согласно обзору 2019 года, проведенному Aluri J. et al. в Индии, среди 57 человек с тяжелым комбинированным иммунодефицитом в 21% случаев встречался кандидоз полости рта [7]. Наиболее часто в литературе описываются поражения слизистой оболочки полости рта грибковой или вирусной природы инфекциями [8], которые могут проявляться в поверхностных слоях тканей полости рта или в глубоких, в виде язвенного стоматита. Синдром хронического кожно-слизистого кандидоза наблюдается при многих первичных иммунодефицитных состояниях [13, 14]. Однако как самостоятельное заболевание он ассоциируется с врожденными дефектами молекул IL-17A/C/F и их рецепторов. В случае синдрома активации STAT1 кожно-слизистый кандидоз сопровождается различными бактериальными и вирусными инфекциями. Дефицит

CARD9, помимо кандидоза слизистых оболочек, способствует развитию инвазивных грибковых инфекций [9, 11]. Сочетанное поражение кандидозом и микобактериозом характерно для мутаций гена RORC [10].

Афтозные и язвенные поражения слизистой полости рта часто сопровождают аутовоспалительные синдромы и были зарегистрированы как одно из самых частых проявлений нескольких синдромов, включая периодическую лихорадку, синдром Маршалла (PFAPA), семейную средиземноморскую лихорадку (FMF) и гипериммуноглобулинемию [12].

Таким образом, воспалительные заболевания челюстно-лицевой области и полости рта зачастую имеют сложную этиологию и ассоциированы с иммунодефицитами, что требует комплексного подхода к лечению.

Цель исследования — оценить частоту встречаемости воспалительных заболеваний стоматологического профиля у пациентов с врожденными ошибками иммунитета.

Материалы и методы

В работе были проанализированы данные шестидесяти четырех пациентов Свердловской областной клинической больницы № 1 и Областной детской клинической больницы города Екатеринбурга (табл. 1). Общий возрастной диапазон людей от 3 до 70 лет, из них 21 человек — 3-6 лет, 21 человек — 7-11 лет, 14 человек — 12-18 лет и 8 человек старше 18 лет.

У всех пациентов проводилась оценка анамнеза стоматологических заболеваний с использова-

ТАБЛИЦА 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИХ ГРУПП

TABLE 1. CHARACTERISTICS OF RESEARCH GROUPS

№ исследовательской группы Research group No.	Диагноз «первичный иммунодефицит» Diagnosis of primary immunodeficiency	Число пациентов Patients number
1	Комбинированные иммунодефициты Combined immunodeficiencies	24
2	Дефекты антител Antibody defects	13
3	Аутовоспалительные нарушения Autoinflammatory disorders	15
4	Дефекты числа и функций фагоцитов Defects in the number and function of phagocytes	10
5	Дефекты иммунной дисрегуляции Defects in immune dysregulation	2
6	Дефекты комплемента Complement defects	1
7	Неверифицированный диагноз Unverified diagnosis	5

ТАБЛИЦА 2. РАСПРЕДЕЛЕНИЕ СТОМАТОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ПО ГРУППАМ ПАЦИЕНТОВ С ПИД

TABLE 2. DISTRIBUTION OF DENTAL DISEASES BY GROUPS OF PATIENTS WITH PID

№ группы Group No.	Число случаев, % Number of cases, %	Медиана, % Median, %	Среднеквадратичное отклонение, % Standard deviation, %
Лимфаденит челюстно-лицевой области Lymphadenitis of the maxillofacial region			
1	16,7	10,4	4,2
2	38,4	23	11,8
3	40	23	16,0
4	50	30	9,6
5	50	50	35,5
7	20	12,4	6,2
Рецидивирующие стоматиты и язвы Recurrent stomatitis and ulcers			
1	12,5	8,3	2,9
2	53,8	31	9,0
3	60	33	25,7
4	70	40	15,0
5	50	50	35,5
7	60	29	23,7
Хейлит Cheilitis			
1	16,7	10,4	3,0
2	46	27	7,7
3	47	27	6,4
4	50	30	9,6
5	50	50	35,5
7	60	29	23,7

нием формы 043-У, выполнялся осмотр полости рта, фиксировалось состояние твердых тканей зубов, пародонта, слизистой оболочки полости рта и костной ткани. Перед проведением осмотра было получено индивидуальное информированное согласие на медицинское вмешательство от пациентов или их законных представителей (родителей). Все диагнозы устанавливались в соответствии с критериями Международной классификации болезней (МКБ-10).

Статистическая обработка данных, включая параметрические и непараметрические методы, осуществлялась с использованием программного пакета IBM® SPSS Statistics® 20.

Результаты и обсуждение

У пациентов, включенных в исследование, были обнаружены не только зубочелюстные аномалии, которые ранее уже описывались [3], но и воспалительные заболевания челюстно-лицевой

области (ЧЛО), слизистой оболочки полости рта: «лимфаденопатия ЧЛО», «хейлит», «глоссит», «верхнечелюстные синуситы», «абсцессы/флегмоны ЧЛО», «кандидоз», «рецидивирующие язвы и стоматиты слизистой оболочки полости рта» (табл. 2).

Симптом «лимфаденит челюстно-лицевой области» встречался в 31,4% случаев, симптом «рецидивирующие стоматиты и язвы» составил 33%, симптом «хейлит» встречался в 36% случаев среди пациентов с первичными иммунодефицитами (ПИД).

В 6-й группе — «дефекты комплемента» лимфаденита челюстно-лицевой области, стоматитов, язв, хейлита обнаружено не было.

Симптом «кандидоз слизистой оболочки полости рта» был отмечен у 1,4% пациентов. В подгруппе с нарушениями иммунной регуляции он встречался у 50% пациентов (1 случай), а в под-

группе с комбинированными иммунодефицитами — у 4,2% (1 случай).

Симптом «верхнечелюстной синусит» наблюдался у 14,2% пациентов с первичными иммунодефицитами (ПИД). В подгруппе с дефектами антител его распространенность достигла 46%, а в подгруппе с аутовоспалительными нарушениями — 13%.

Симптом «абсцессы и флегмоны челюстно-лицевой области» был обнаружен у 4% пациентов. В подгруппе с аутовоспалительными нарушениями он встречался в 13% случаев, а в подгруппе с дефектами фагоцитоза — в 10%.

Симптом «глоссит» отмечался у 1,4% пациентов, при этом в подгруппе с неverified диагнозами его частота составляла 20%.

Заключение

Клинические проявления стоматологического характера при врожденных нарушениях иммунитета отличаются значительным разнообразием. При этом индивидуальность каждого клинического случая имеет в основе уникальный патогенез.

Гингивит, стоматиты, абсцессы, часто встречающиеся симптомы как у пациентов с ПИД, так и у пациентов без ПИД. Поэтому наличие гингивита само по себе не может свидетельствовать о наличии иммунодефицита, но характер его течения, устойчивость, резистентность к традиционной терапии и реакция на общую терапию внутривенными иммуноглобулинами могут быть настораживающими признаками. В группе ПИД достоверно чаще встречались такие признаки, как кандидоз и синуситы, которые являются патогномоничными симптомами иммунодефицитов и генетических нарушений.

Проведенные в исследовании клинические осмотры и изучение врожденных ошибок иммунитета с точки зрения стоматологии позволяют создать специальные критерии диагностики для помощи практическим специалистам в том, чтобы своевременно заподозрить иммунодефицит, правильно маршрутизировать пациента, обеспечить раннюю диагностику и необходимое, патогенетически обоснованное лечение.

Список литературы / References

1. Иванова О.Н., Бурцева Т.Е., Слободчикова М.П., Иванова И.С. Клинический случай селективного дефицита Ig A // Уральский медицинский журнал, 2020. № 10 (193). С. 46-48. [Ivanova O.N., Burtseva T.E., Slobodchikova M.P., Ivanova I.S. Clinical case of selective deficiency Ig A. *Uralskiy meditsinskiy zhurnal = Ural Medical Journal*, 2020, no. 10 (193), pp. 46-48. (In Russ.)]
2. Коваленко К.Е., Поликарпова И.И. Клинический случай врожденного герпетического менингоэнцефалита // Уральский медицинский журнал, 2020. № 4 (187). С. 140-145. [Kovalenko K.E., Policarpova I.I., A clinical case of congenital herpetic meningoencephalitis. *Uralskiy meditsinskiy zhurnal = Ural Medical Journal*, 2020, no. 4 (187), pp. 140-145. (In Russ.)]
3. Саркисян Н.Г., Тузанкина И.А., Катаева Н.Н., Меликян А.Г., Осипова И.М. Зубочелюстные аномалии при врожденных ошибках иммунитета // Российский иммунологический журнал, 2024. Т. 27, № 2. С. 217-222. [Sarkisyan N.G., Tuzankina I.A., Kataeva N.N., Melikyan A.H., Osipova I.M. Dental anomalies in congenital error of immunity. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2024, Vol. 27, no. 2, pp. 217-222. (In Russ.)] doi: 10.46235/1028-7221-16812-DAI.
4. Удилов В.С., Сабитов А.У., Берсенева Т.В. Случай листериозного сепсиса у ВИЧ-инфицированного пациента // Уральский медицинский журнал, 2016. № 9 (142). С. 130-133. [Udilov V.S., Sabitov A.U., Berseneva T.V. Listerioses case of sepsis in HIV infected patient. *Uralskiy meditsinskiy zhurnal = Ural Medical Journal*, 2016, no. 9 (142), pp. 130-133. (In Russ.)]
5. Уфимцева М.А., Сабитов А.У., Савченко Н.В., Подымова А.С., Ворошилина Е.С., Бочкарёв Ю.М., Гордон Е.О. Особенности микробиоты кожи у ВИЧ-инфицированных детей // Уральский медицинский журнал, 2020. № 4 (187). С. 94-97. [Ufimtseva M.A., Sabitov A.U., Savchenko N.V., Podymova A.S., Voroshilina E.S., Bochkarev Yu.M., Gordon E.A., Skin microbiota in HIV-positive children. *Uralskiy meditsinskiy zhurnal = Ural Medical Journal*, 2020, no. 4 (187), pp. 94-97. (In Russ.)]
6. Хайбуллина Р.Р., Гильмутдинова Л.Т., Герасимова Л.П., Викторов В.В., Макушева Н.В., Шамсиев М.Р. Особенности местного иммунитета полости рта у пациентов с хроническим генерализованным пародонтитом и бруксизмом // Уральский медицинский журнал, 2017. № 11 (155). С. 63-66. [Khaybullina R.R., Gilmutdinova L.T., Gerasimova L.P., Victorov V.V., Makusheva N.V., Shamsiev M.R. Features of local immunity of the oral cavity in patients with chronic generalized periodontitis and bruxism. *Uralskiy meditsinskiy zhurnal = Ural Medical Journal*, 2017, no. 11 (155), pp. 63-66. (In Russ.)]
7. Aluri J., Desai M., Gupta M., Dalvi A., Terance A., Rosenzweig S.D., Stoddard J.L., Niemela J.E., Tamankar V., Mhatre S., Bargir U., Kulkarni M., Shah N., Aggarwal A., Lashkari H.P., Krishna V., Govindaraj G., Kalra M., Madkaikar M. Clinical, immunological, and molecular findings in 57 patients with severe combined immunodeficiency (SCID) from India. *Front. Immunol.*, 2019, Vol. 10, 23. doi: 10.3389/fimmu.2019.00023.

8. Barasa A., Ahmed I., Rajab J., Walong E. Persistent oral candidiasis and disseminated BCGosis as manifestations of a possible inborn error of immunity. *Curr. Allergy Clin. Immunol.*, 2021, Vol. 34, no. 1, pp. 48-50.
9. Lanternier F., Mahdavian S.A., Barbati E., Chaussade H., Koumar Y., Levy R., Denis B., Brunel A.-S., Martin S., Loop M., Peeters J., de Selys A., Vanclaire J., Vermeylen C., Nassogne M.-C., Chatzis O., Liu L., Migaud M., Pedergrana V., Desoubeaux G., Jouvion G., Chretien F., Darazam I.A., Schäffer A.A., Netea M.G., de Bruycker J.J., Bernard L., Reynes J., Amazrine N., Abel L., Van der Linden D., Harrison T., Picard C., Lortholary O., Mansouri D., Casanova J.-L., Puel A. Inherited CARD9 deficiency in otherwise healthy children and adults with Candida species-induced meningoencephalitis, colitis, or both. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2015, Vol. 135, no. 6, pp. 1558-1568.
10. Okada S., Markle J.G., Deenick E.K., Mele F., Averbuch D., Lagos M., Alzahrani M., Al-Muhsen S., Halwani R., Ma C.S., Wong N., Soudais C., Henderson L.A., Marzouqa H., Shamma J., Gonzalez M., Martinez-Barricarte R., Okada C., Avery D.T., Latorre D., Deswarte C., Jabot-Hanin F., Torrado E., Fountain J., Belkadi A., Itan Y., Boisson B., Migaud M., Arlehamn C.S.L., Sette A., Breton S., McCluskey J., Rossjohn J., de Villartay J.-P., Moshous D., Hambleton S., Latour S., Arkwright P.D., Picard C., Lantz O., Engelhard D., Kobayashi M., Abel L., Cooper A.M., Notarangelo L.D., Boisson-Dupuis S., Puel A., Sallusto F., Bustamante J., Tangye S.G., Casanova J.-L. Impairment of immunity to Candida and Mycobacterium in humans with bi-allelic RORC mutations. *Science*, 2015, Vol. 349, no. 6248, pp. 606-613.
11. Okada S., Puel A., Casanova J.-L., Kobayashi M. Chronic mucocutaneous candidiasis disease associated with inborn errors of IL-17 immunity. *Clin. Transl. Immunology*, 2016, Vol. 5, no. 12, e114. <https://doi.org/10.1038/cti.2016.71>.
12. Scully C., Hodgson T., Lachmann H. Auto-inflammatory syndromes and oral health. *Oral Dis.*, 2008, Vol. 14, no. 8, pp. 690-699.
13. Wang X., Wang W., Lin Z., Wang X., Li T., Yu J., Liu W., Tong Z., Xu Y., Zhang J., Guan L., Dai L., Yang Y., Han W., Li R. CARD9 mutations linked to subcutaneous phaeohyphomycosis and TH17 cell deficiencies. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2014, Vol. 133, no. 3, pp. 905-908.
14. Wang X., Zhang R., Wu W., Song Y., Wan Z., Han W., Li R. Impaired specific antifungal immunity in CARD9-deficient patients with phaeohyphomycosis. *J. Invest. Dermatol.*, 2018, Vol. 138, no. 3, pp. 607-617.

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, доцент кафедры общей химии ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Екатеринбург, Россия

Демидов С.Д. — врач-стоматолог, стоматологическая клиника «Дента ОС», г. Екатеринбург, Россия

Мкртчян И.Г. — врач кабинета медицинской профилактики, Поликлиника № 2, Центральная городская клиническая больница № 6, г. Екатеринбург, Россия

Меликян А.Г. — ординатор кафедры хирургической стоматологии ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Екатеринбург, Россия

Осипова И.М. — ординатор кафедры терапевтической стоматологии 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, Postgraduate Department, Institute of Immunology and Physiology, Ekaterinburg, Russian Federation

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

Demidov S.D., Dentist, Dental Clinic "Denta OS", Ekaterinburg, Russian Federation

Mkrtchyan I.G., Physician at Medical Prevention Office, Polyclinic No. 2, Central City Clinical Hospital No. 6, Ekaterinburg, Russian Federation

Melikyan A.H., Resident, Department of Surgical Dentistry, Ural State Medical University, Ekaterinburg, Russian Federation

Osipova I.M., Resident, Department of Therapeutic Dentistry, Ural State Medical University, Ekaterinburg, Russian Federation

Поступила 07.03.2025

Отправлена на доработку 09.05.2025

Принята к печати 25.05.2025

Received 07.03.2025

Revision received 09.05.2025

Accepted 25.05.2025

КЛАСТЕРНЫЙ АНАЛИЗ ИММУНОГРАММЫ ОБУЧАЮЩИХСЯ С РАЗНЫМ УРОВНЕМ ДВИГАТЕЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ

Колупаев В.А., Сашенков С.Л., Котова Н.В.

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

Резюме. Состояние иммунной системы жестко ограничивает возможности адаптации организма к физическим нагрузкам, а определенные сочетания показателей иммунограммы, связанные с механизмами неспецифической резистентности при адаптации к мышечной работе, проспективно отражают значимое снижение надежности функционирования защитных механизмов. В этом случае систематизация соотношений показателей иммунограммы у лиц с разным двигательным режимом является актуальным для выяснения принципов дозирования мышечных нагрузок адекватных состоянию механизмов неспецифической резистентности и иммунореактивности. Цель исследования состояла в сокращении числа исследуемых переменных с дифференциацией выборки на подгруппы для выявления закономерностей близких по свойствам сгруппированных объектов. У обучающихся в возрасте 18–24 лет (юноши $n = 40$ и девушки $n = 40$), не имеющих противопоказаний для занятий физическими упражнениями, в состоянии покоя выполнен анализ показателей лейко- и иммунограммы с последующим определением уровня физической работоспособности в тесте PWC170. Обучающиеся с ординарным режимом двигательной активности составили основное отделение ($n = 34$); студенты, занимающиеся легкой атлетикой – спортивное отделение ($n = 27$); обучающиеся с низким уровнем физической подготовленности – подготовительное отделение ($n = 19$). Изучение фагоцитарной и НСТ-активности нейтрофилов и содержания CD-лимфоцитов в крови осуществляли методом иммунофенотипирования с применением проточной цитометрии. Сравнение результатов осуществляли на основе U-критерия Манна–Уитни в программе Statistica. Группировку испытуемых на основе состояния показателей иммунограммы осуществляли с помощью дивизивной кластеризации методом k-средних. По результатам 3 итераций 65 показателей лейко- и иммунограммы выделены 13 кластеров, центроиды которых являлись переменными в кластеризации испытуемых. В итоге 4 итераций по 13 переменным были выделены 5 кластеров испытуемых. Первый кластер включал лиц с избыточной величиной индекса массы тела и характеризовался низким уровнем индуцированного НСТ-теста Нф и высоким содержанием TNK и дубль-негативных Лф у них. Второй кластер включал представителей исследуемых групп с преимущественно средним и низким уровнем физической работоспособности, отличавшихся низкой активностью фагоцитоза, количества NK, TNK и дубль негативных клеток и высоким содержанием Т-цитотоксических Лф. Третий кластер, включающий преимущественно спортсменов с высоким и средним уровнем двигательной выносливости, отражал высокий уровень индуцированного НСТ-теста Нф и низкое содержание цитотоксических Т-лимфоцитов. Четвертый

Адрес для переписки:

Колупаев Виталий Анатольевич
ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный
медицинский университет» Министерства
здравоохранения РФ
454092, Россия, г. Челябинск, ул. Воровского, 64.
Тел.: 8 (351) 261-25-96.
E-mail: chel.med.fizkult@mail.ru

Address for correspondence:

Vitaly A. Kolupaev
South Ural State Medical University
64 Vorovsky St
Chelyabinsk
454092 Russian Federation
Phone: +7 (351) 261-25-96.
E-mail: chel.med.fizkult@mail.ru

Образец цитирования:

В.А. Колупаев, С.Л. Сашенков, Н.В. Котова
«Кластерный анализ иммунограммы обучающихся
с разным уровнем двигательной активности»
// Российский иммунологический журнал, 2025. Т. 28,
№ 3. С. 861–866.
doi: 10.46235/1028-7221-17183-CAO
© Колупаев В.А. и соавт., 2025
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

V.A. Kolupaev, S.L. Sashenkov, N.V. Kotova “Cluster
analysis of immunograms of trainees with different levels
of motor activity”, Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy
Immunologicheskii Zhurnal, 2025, Vol. 28, no. 3, pp. 861–866.
doi: 10.46235/1028-7221-17183-CAO
© Kolupaev V.A. et al., 2025
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.46235/1028-7221-17183-CAO

кластер включал лиц с низким и средним уровнем физической работоспособности, с высокой фагоцитарной и спонтанной НСТ-активностью Нф, содержания НК-клеток, $CD3^+CD19^-$ и $CD3^+CD4^+CD8^-CD45^+$ лимфоцитов. Пятый кластер включал лиц всех исследуемых групп разного уровня физической работоспособности и характеризовался высокими значениями фагоцитарного числа Нф, низкого спонтанного НСТ-теста, содержания $CD3^+CD16^+CD56^+$ и $CD3^+CD4^-CD8^-CD45^+$.

Ключевые слова: фагоцитоз нейтрофилов, НСТ-активность нейтрофилов, физическая нагрузка, CD-лимфоциты

CLUSTER ANALYSIS OF IMMUNOGRAMS OF TRAINEES WITH DIFFERENT LEVELS OF MOTOR ACTIVITY

Kolupaev V.A., Sashenkov S.L., Kotova N.V.

South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

Abstract. The state of immune system may severely limit abilities of the body to adapt to physical exercises. Certain combinations of immunogram indexes associated with non-specific resistance when adapting to muscle work may prospectively reflect a significant decrease in reliable functioning of these protective mechanisms. In this case, systematization of immunogram-derived indices in persons with different motor habits is relevant to clarify the principles of dosing muscle loads adequate to the state of the non-specific resistance mechanisms and immunoreactivity. The purpose of the study was to reduce the number of studied variables by differentiating the sample into subgroups in order to identify similar patterns for the grouped objects. In students aged 18-24 years (boys $n = 40$ and girls $n = 40$) without any contraindications for exercise, leuko- and immunogram parameters were analyzed, along with determination of physical performance level by the PWC170 test. Students with an ordinary mode of motor activity made up the main group ($n = 34$); track-and-field athletes comprised an athletic group ($n = 27$); low-fitness scholars, prep group ($n = 19$). The study of phagocytic and NBT activity of neutrophils and the content of CD lymphocytes in the blood was carried out by immunophenotyping using flow cytometry. Results were compared by the Mann–Whitney U test with Statistica software. Grouping of subjects based on the state of the immunogram parameters was carried out using divisional clustering by the k-means method. Based on the results of 3 iterations of 65 leuko- and immunogram indices, 13 clusters were identified, the centroids of which were variables in the clustering of subjects. As a result of 4 iterations of 13 variables, 5 clusters of subjects were discerned. The first cluster included individuals with an excess value of body mass index and was characterized by a low level of induced NBT-test neutrophils and a high content of $CD3^+CD16^+CD56^+$ and a double-negative $CD3^+CD4^-CD8^-CD45^+$ lymphocytes subset. The second cluster included the members of a study groups with a predominantly medium and low level of physical performance, characterized by low phagocytosis activity, of $CD3^-CD16^+CD56^+$, and $CD3^+CD16^+CD56^+$ numbers, double-negative $CD3^+CD4^-CD8^-CD45^+$ lymphocytes and a high content of T cytotoxic $CD3^+CD4^-CD8^+CD45^+$ lymphocytes. The third cluster, comprising predominantly athletes with high and medium levels of motor endurance, exhibited high levels of NBT-induced neutrophils and low cytotoxic T lymphocyte $CD3^+CD4^-CD8^+CD45^+$ counts. The fourth cluster included individuals with low and medium levels of physical performance, with high phagocytic and spontaneous NBT-activity of neutrophils, $CD3^-CD16^+CD56^+$ cell content, $CD3^+CD19^-$ and $CD3^+CD4^+CD8^-CD45^+$ lymphocytes. The fifth cluster included individuals of different study groups with varying levels of physical performance and was characterized by high counts of phagocytic neutrophils, low values of spontaneous NBT-test, $CD3^+CD16^+CD56^+$ and $CD3^+CD4^-CD8^-CD45^+$.

Keywords: neutrophil phagocytic, neutrophil NBT-activity, physical loads, CD lymphocytes

Введение

Состояние системы иммунитета физкультурников и спортсменов в значительной степени обуславливает уровень адекватности физических нагрузок в зависимости от степени активности защитных механизмов при обеспечении иммунного гомеостаза в ответ на воздействие разнообразных биотических и абиотических факторов внешней среды. Для целого ряда лиц, занимаю-

щихся физическими упражнениями, состояние иммунитета достаточно жестко ограничивает возможности организма при адаптации к физическим нагрузкам. Для других занимающихся некоторые отклонения показателей иммунограммы от нормы являются отражением дисбаланса метаболизма в связи с недостаточным уровнем двигательной активности либо могут служить подтверждением преходящего снижения физической работоспособности в связи с текущей реакцией

организма на воздействие биотических факторов внешней среды [4]. Помимо того, определенные сочетания показателей иммунограммы, тесно связанные с адаптацией [1], в том числе к физической нагрузке, могут отражать существенное снижение надежности функционирования защитных механизмов. В этом случае систематизация и классификация типов связи показателей иммунограммы у обучающихся с разным уровнем повседневной двигательной активности является актуальным для определения рекомендаций по определению адекватных по уровню физических нагрузок.

Цель исследования состояла в сокращении числа исследуемых переменных с дифференциацией выборки на подгруппы для выявления закономерностей близких по свойствам сгруппированных объектов.

Материалы и методы

У обучающихся медицинского университета в возрасте 18-24 лет (юноши $n = 40$ и девушки $n = 40$) различной физической подготовленности и с разным уровнем повседневной двигательной активности, не имеющих противопоказаний для занятий физическими упражнениями, в состоянии покоя выполнен забор крови из локтевой вены с определением показателей лейко- и иммунограммы с последующим определением уровня физической работоспособности в тесте PWC170 по скорости передвижения на беговой дорожке. Обучающиеся с ординарным режимом двигательной активности (2 ч в неделю на занятиях по физической культуре) составили основное отделение ($n = 34$); обучающиеся, занимающиеся легкой атлетикой 3 раза в неделю по 2 ч, – спортивное отделение ($n = 27$); обучающиеся с низкой физической подготовленностью, занимающиеся физической культурой 1 раз в неделю в щадящем режиме, – подготовительное отделение ($n = 19$). Исследования проведены с информированного согласия испытуемых в соответствии с этическими нормами Хельсинкской декларации 2001 г.

Определение показателей лейко- и иммунограммы проводили на базе клинико-диагностической лаборатории «ДокторЛаб» (лицензия № Л041-01024-74/00316445 от 27.09.2017). Оценку фагоцитоза и НСТ-активности нейтрофилов (Нф) и определение содержания CD-лимфоцитов (Лф) в периферической крови методом иммунофенотипирования осуществляли с применением проточной цитометрии [2], а определение содержания антител иммуноглобулинов класса А и М (IgA и IgM) в сыворотке крови к вирусу SARS-CoV-2 (COVID-19) выполняли методом иммуноферментного анализа на основе тест-систем (АО «Вектор-Бест», Россия) [5].

Статистическую обработку и сравнение результатов осуществляли с применением пара-

метрических и непараметрических методов для несвязанных выборочных (U-критерий Манна–Уитни) с применением пакета прикладных программ Excel и Statistica. Группировку испытуемых на основе состояния показателей иммунограммы осуществляли с помощью дивизивной кластеризации методом k-средних, что позволяет выделить группы с сопоставимыми характеристиками на основании анализа особенностей распределения исследуемых переменных в выборке [3].

Результаты и обсуждение

На начальном этапе исследования после стандартизации исходных значений показателей лейко- и иммунограммы мы провели кластеризацию 65 исследуемых переменных у обучающихся с разным уровнем физической работоспособности и различным уровнем повседневной двигательной активности. В результате 3 итераций выделены 13 кластеров переменных, охвативших всех испытуемых по соотношению внутри- и межгрупповой дисперсий. Центроиды данных кластеров были выбраны в качестве переменных при кластеризации испытуемых на следующем этапе исследования. За счет 4 итераций при кластеризации обследуемых методом k-средних по 13 переменным были выделены 5 кластеров испытуемых, включающие данные всех наблюдений у обучающихся с разным уровнем двигательной активности. Состав кластеров, с дифференциацией включенных в них обследованных юношей и девушек по величине индекса массы тела, представлен в таблице 1.

Как видно из представленных данных, в состав каждого со второго по пятый кластер входило от 21% до 26% обследованных в соотношении юношей и девушек 1:1. При этом к первому кластеру были отнесены лишь 7,5% испытуемых, 2/3 из которых представлены юношами основной группы с ординарным уровнем двигательной активности, а 1/3 – девушками с низким уровнем физической подготовки и щадящим режимом двигательной деятельности. Индекс массы тела у одной из девушек из первого кластера соответствовал нормальным значениям, а у другой – характеризовался избыточной величиной. У всех юношей, вошедших в состав первого кластера, отмечался избыточный уровень индекса массы тела. Ввиду небольшого числа включенных в исследование наблюдаемых, иных выраженных тенденций распределения обследованных по кластерам в зависимости от величины индекса массы тела мы не отмечаем, за исключением уменьшения в составе четвертого кластера доли юношей с нормальной величиной индекса массы тела за счет присутствия лиц с избыточной величиной индекса массы тела и лиц с признаками ожирения.

ТАБЛИЦА 1. СОСТАВ КЛАСТЕРОВ В СВЯЗИ С УРОВНЕМ ИНДЕКСА МАССЫ ТЕЛА ОБСЛЕДОВАННЫХ ЮНОШЕЙ И ДЕВУШЕК

TABLE 1. THE COMPOSITION OF CLUSTERS IN RELATION TO THE BODY MASS INDEX LEVEL OF THE SURVEYED BOYS AND GIRLS

Пол / Gender	Индекс массы тела Body mass index	№ кластера / Cluster number					В ряду Row
		1	2	3	4	5	
Юноши Young men	Дефицит / Deficit	0	0	0	0	1	1
	Нормальный / Normal	0	7	6	3	5	21
	Избыток / Excess	4	3	2	2	3	14
	Ожирение 1-й степени Grade 1 obesity	0	0	1	2	0	3
	Ожирение 3-й степени Grade 3 obesity	0	0	0	1	0	1
	Всего / Total	4	10	9	8	9	40
	%	5,00	12,50	11,25	10,00	11,25	50,00
Девушки Girls	Дефицит / Deficit	0	2	2	1	1	6
	Нормальный / Normal	1	9	5	8	6	29
	Избыток / Excess	1	0	1	0	3	5
	Всего / Total	2	11	8	9	10	40
	%	2,50	13,75	10,00	11,25	12,50	50,00
Общий процент / Total percent		7,50	26,25	21,25	21,25	23,75	100

Результаты сравнения показателей иммунограммы испытуемых из разных кластеров представлены в таблице 2. Как видно из этих данных, показатели испытуемых первого кластера характеризовались высокими значениями относительного и абсолютного содержания $CD3^+CD16^+CD56^+$ и $CD3^+CD4^+CD8^+CD45^+$ лимфоцитов, а также содержания НСТ-негативных Нф в индуцированном тесте на фоне сниженных до уровня нижней границы нормы фагоцитарного числа Нф. Во второй кластер с высоким уровнем процентного содержания $CD3^+CD4^+CD8^+CD45^+$ клеток и низким уровнем количества фагоцитов, сниженным количеством $CD3^+CD4^+CD8^+CD45^+$ и $CD3^+CD16^+CD56^+$ лимфоцитов, а также НК-клеток включен 21 испытуемый. 42,86% из их числа представляли спортивное и основное отделения и характеризовались высокими показателями физической работоспособности в тесте PWC170. 28,57% наблюдаемых второго кластера характеризовались средним уровнем физической работоспособности и столько же — низкой аэробной производительностью. Третий кластер составили данные 17 испытуемых с высокими значениями индекса активности и резервных возможностей в индуцированном НСТ-тесте Нф на фоне низкого уровня содержания $CD3^+CD4^+CD8^+CD45^+$ лимфоцитов и спонтанного НСТ-теста Нф. 58,82% испытуемых из этого кластера были представителями спортивного отделения с высоким и средним уровнем физической работоспособности.

В состав четвертого кластера вошли 17 наблюдаемых с высоким уровнем количества Нф, активности фагоцитоза и спонтанного НСТ-теста, а также абсолютного содержания $CD3^+CD19^+$ и $CD3^+CD4^+CD8^+CD45^+$ лимфоцитов, а также $CD3^+CD16^+CD56^+$ клеток на фоне низких значений индекса активности НСТ-теста Нф. Испытуемые четвертого кластера в 47,06% случаев являлись представителями подготовительного отделения со щадящим режимом двигательной активности, а в целом 70,59% состава данного кластера из числа основного и подготовительного отделений характеризовались низким уровнем физической работоспособности в тесте PWC170. В пятый кластер вошли 19 наблюдений с высоким уровнем фагоцитарного числа Нф, количества и содержания $CD3^+CD16^+CD56^+$ клеток на фоне низких значений индекса активности НСТ-теста Нф и сниженного содержания $CD3^+CD4^+CD8^+CD45^+$ и $CD3^+CD16^+CD56^+$ лимфоцитов. 47,37% испытуемых пятого кластера представляли лиц с ординарным уровнем двигательной активности, 36,84% — спортсмены с высокой двигательной активностью и 15,79% — лица со щадящим режимом двигательной деятельности. При этом все спортсмены данного кластера проявляли высокий уровень физической работоспособности, тогда как лишь 1/3 часть испытуемых основного и подготовительного отделения из состава этого кластера демонстрировали средний уровень физической выносливости, а 2/3 из этого числа — низкий уровень аэробной производительности.

ТАБЛИЦА 2. ЗНАЧЕНИЯ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ИММУНОГРАММЫ В СОСТАВЕ КЛАСТЕРОВ, Ме ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

TABLE 2. VALUES OF IMMUNOGRAM PARAMETERS IN CLUSTERS, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

Показатели Indicators	Номер кластера / Cluster number				
	1 (n = 6)	2 (n = 21)	3 (n = 17)	4 (n = 17)	5 (n = 19)
Фагоцитарное число, усл. ед. Phagocytic number, c. e.	3,5 (2,3-3,7)	3,4 (2,8-4,9)	3,7 (2,9-4,2)	4,6 (3,4-5,2) ¹	8,3 (6,8-9,1) ^{1, 2, 3, 4}
Спонтанный НСТ-тест, % Spontaneous NBT-test, %	22 (17-24)	22 (14-29)	11 (7-15) ^{1, 2}	36 (29-44) ^{1, 2, 3}	29 (23-36) ^{2, 3, 4}
Индукцированный НСТ-тест, % Induced NBT-test, %	51 (42-64)	69 (57-79)	70 (67-79) ¹	68 (59-76) ¹	54 (41-63) ^{2, 3, 4}
CD3 ⁺ CD19 ⁺ CD45 ⁺ , % × 10 ⁶ /L	80,1 (77,8-82,5) 1621 (1491-1905)	80,3 (77,5-82,6) 1514 (1222-1685)	73,9 (69,6-79,5) ^{1, 2} 1335 (1151-1765)	75,5 (69,4-79,4) 1819 (1598-1928) ^{2, 3}	75,6 (72,4-79,4) ^{1, 2} 1274 (1018-1565) ^{1, 4}
CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁺ CD45 ⁺ , % × 10 ⁶ /L	38,0 (36,3-42,4) 839 (673-844)	46,1 (41,6-52,6) ¹ 841 (704-1043)	41,4 (38,8-45,8) 786 (616-991)	43,2 (38,6-46,5) 1028 (841-1144) ^{2, 3}	45,0 (39,4-50,2) ¹ 702 (619-912) ⁴
CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁺ CD45 ⁺ , % × 10 ⁶ /L	27,9 (25,9-29,5) 625 (502-654)	29,6 (26,4-31,2) 537 (462-636)	23,2 (21,3-24,7) ^{1, 2} 380 (308-582) ¹	24,0 (22,3-27,6) ² 560 (477-644) ³	26,0 (24,3-29,2) ^{2, 3} 466 (338-548) ^{1, 4}
CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁺ CD45 ⁺ , % × 10 ⁶ /L	11,6 (8,6-19,2) 282 (183-379)	3,6 (2,3-5,2) ¹ 63 (46-80) ¹	7,8 (6,3-10,9) ² 157 (104-221) ²	6,6 (4,4-7,8) ^{1, 2} 141 (119-210) ²	4,5 (1,2-6,4) ^{1, 3, 4} 75 (26-118) ^{1, 3, 4}
CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁺ CD45 ⁺ , % × 10 ⁶ /L	0,2 (0,1-0,3) 3,0 (2,1-6,0)	0,3 (0,3-0,5) 5,9 (4,2-10,9)	0,5 (0,3-0,8) 10,4 (5,6-17,2)	0,4 (0,2-1,3) 10,6 (5,4-29,2) ¹	0,4 (0,2-0,8) 6,6 (4,1-12,5)
CD3 ⁺ CD19 ⁺ CD45 ⁺ , % × 10 ⁶ /L	11,5 (10,5-12,2) 224 (209-249)	10,0 (8,0-12,1) 174 (153-204) ¹	10,8 (7,7-13,1) 203 (170-273)	9,8 (6,9-12,2) 240 (172-274)	8,3 (6,3-12,2) 150 (131-183) ^{1, 3, 4}
CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺ , % × 10 ⁶ /L	7,0 (6,3-7,6) 129 (117-168)	8,7 (6,4-10,5) 134 (102-202)	11,7 (6,7-17,6) ² 195 (124-279)	10,3 (6,2-15,0) 238 (142-405) ^{1, 2}	13,7 (10,3-16,4) ^{1, 2} 265 (165-308) ^{1, 2}
CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺ , % × 10 ⁶ /L	10,4 (9,5-10,7) 235,0 (188,7-278,5)	1,2 (0,5-2,2) ¹ 22,7 (10,2-41,5) ¹	2,7 (0,9-3,1) ¹ 47,6 (24,1-74,9) ¹	3,3 (1,7-3,6) ^{1, 2} 73,5 (40,3-87,4) ^{1, 2}	1,5 (0,9-2,6) ¹ 27,7 (15,6-61,8) ^{1, 4}

Примечание. Условные обозначения: ^{1, 2, ...} – по критерию Манна–Уитни значимые различия с показателями соответствующего кластера.

Note. Symbols: ^{1, 2, ...}, according to Mann–Whitney test there are significant differences with the indicators of the corresponding cluster.

Таким образом, результаты кластеризации обучающихся различной физической подготовленности с разным уровнем ежедневной двигательной активности на основе состояния показателей иммунограммы позволили выделить 5 типов состояния иммунной системы у студентов, не имеющих противопоказаний для занятий

физическими упражнениями. Первый кластер, включающий лиц с избыточной величиной индекса массы тела, характеризовался низкой способностью к стимуляции кислородзависимого метаболизма Нф на фоне повышения содержания ТНК и дубль-негативных лимфоцитов. Второй кластер, включающий в сопоставимых про-

порциях представителей всех исследуемых групп с преимущественно средним и низким уровнем физической работоспособности, характеризовался низкой активностью фагоцитоза, количества НК, TNK и дубль-негативных клеток в сочетании с высоким процентным содержанием Т-цитотоксических Лф. Третий кластер, включающий преимущественно спортсменов с высоким и средним уровнем двигательной выносливости, отражал высокий потенциал резервных возможностей кислородзависимого метаболизма Нф при низком содержании цитотоксических Т-клеток. Четвертый кластер, охватывающий преимущественно испытуемых с низким и средним уровнем физической работоспособности, отличался высокой активностью механизмов врожденного иммунитета (фагоцитоз, спонтанный НСТ-тест и содержание НК-клеток), а также регуляторного Т-клеточного звена адаптивного иммунитета. Пятый кластер, включающий спортсменов с высоким уровнем физической работоспособности и лиц с ординарным и щадящим режимом двига-

тельной активности с низким уровнем аэробной производительности, характеризовался высоким потенциалом механизмов врожденного иммунитета на фоне низкого базального уровня кислородзависимого метаболизма фагоцитов и содержания TNK и дубль-негативных Лф.

Выводы

1. Соотношение юношей и девушек в составе выявленных кластеров не имело значимых различий.
2. В составе первого и четвертого кластеров отмечалась более высокая доля юношей с повышенным индексом массы тела и признаками ожирения по сравнению с таковой в других кластерах.
3. В состав каждого со второго по пятый кластеров входили испытуемые всех обследованных групп с разным соотношением среди них лиц с высоким, средним и низким уровнем физической работоспособности в тесте PWC170.

Список литературы / References

1. Борисов А.Г. Кластерный анализ типов иммунных нарушений при инфекционно-воспалительных заболеваниях // Российский иммунологический журнал, 2014. Т. 8 (17), № 4. С. 1002-1011. [Borisov A.G. Cluster analysis of types of immune disorders in infectious-inflammatory diseases. *Rossiyskiy immunologicheskii zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2014, Vol. 8 (17), no. 4, pp. 1002-1011. (In Russ.)]
2. Зурочка А.В., Хайдуков С.В., Кудрявцев И.В., Черешнев В.А. Проточная цитометрия в биомедицинских исследованиях. Екатеринбург: УрО РАН, 2018. 720 с. [Zurochka A.V., Haidukov S.V., Kudryavtsev I.V., Chereshev V.A. Flow cytometry in biomedical research]. Yekaterinburg: UrO RAS, 2018. 720 p.
3. Касюк С.Т. Анализ данных на компьютере в пакете Statistica. Челябинск: Челябинский филиал РАН-ХиГС, 2018. 346 с. [Kasyuk S.T. Analysis of data on a computer in the Statistica package]. Chelyabinsk: Chelyabinsk branch of Russian Presidential Academy of National Economy and Public Administration, 2018. 346 p.
4. Котова Н.В., Зурочка В.А., Сашенков С.Л., Колупаев В.А., Ключкова С.В. Физическая работоспособность и состояние иммунограммы обучающихся, перенесших COVID-19 // Человек. Спорт. Медицина, 2024. Т. 24, № S1. С. 20-28. [Kotova N.V., Zurochka V.A., Sashenkov S.L., Kolupaev V.A., Klochko S.V. Physical performance and immunogram status of students who have had COVID-19. *Chelovek. Sport. Meditsina = Human. Sport. Medicine*, 2024, Vol. 24, no. S1, pp. 20-28. (In Russ.)]
5. Zurochka A., Dobrinina M., Zurochka V, Hu D., Solovyev A., Ryabova L., Kritsky I., Ibragimov R., Sarapultsev A. Seroprevalence of SARS-CoV-2 antibodies in symptomatic individuals is higher than in persons who are at increased risk exposure: the results of the single-center, prospective, cross-sectional study. *Vaccines*, 2021, Vol. 9, no. 6, 627. doi: 10.3390/vaccines9060627.

Авторы:

Колупаев В.А. — д.б.н., доцент, заведующий кафедрой физической культуры ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Челябинск, Россия

Сашенков С.Л. — д.м.н., профессор, заведующий кафедрой нормальной физиологии ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Челябинск, Россия

Котова Н.В. — старший преподаватель кафедры физической культуры ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Челябинск, Россия

Authors:

Kolupaev V.A., PhD, MD (Biology), Associate Professor, Head, Department of Physical Culture, South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

Sashenkov S.L., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Normal Physiology, South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

Kotova N.V., Senior Lecturer, Department of Physical Culture, South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

Поступила 29.03.2025
Отправлена на доработку 10.05.2025
Принята к печати 31.05.2025

Received 29.03.2025
Revision received 10.05.2025
Accepted 31.05.2025

ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ПСИХОЛОГИЧЕСКОЙ АДАПТАЦИИ В ПРОФЕССИОНАЛЬНОМ ОБРАЗОВАНИИ ВОЕННЫХ ВРАЧЕЙ

Уразмамбетов Р.Т., Андреева И.И., Антонова Е.А.

ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет», г. Ростов-на-Дону, Россия

Резюме. Адекватная адаптация и функционирование в определенной среде обусловлены интеграцией нервной, эндокринной и иммунной систем. Выявление тех изменений в иммунной системе, которые формируются в условиях нарушения психоэмоционального состояния и могут быть использованы в качестве предикторов развития иммунопатологии, представляет особый интерес. Наибольший прикладной выход эти исследования могут найти в условиях наблюдения за когортой молодых практически здоровых взрослых в процессе их профессионального становления. Цель работы – продемонстрировать особенности адаптационных ресурсов иммунной системы военных студентов-медиков в динамике образовательного процесса. Обследованы студенты военного учебного центра (ВУЦ) первого (18 человек), третьего (31) и шестого (34) курсов, соответствующие I группе здоровья. Психологическое тестирование осуществляли с помощью методики Ч.Д. Спилбергера, адаптированной на русский язык Ю.Л. Ханиным, позволяющей дифференцировано измерять степень выраженности ситуативной и личностной тревожности как показателя устойчивости к стрессовым факторам. Для выявления особенностей социально-психологической адаптации к академической среде использовали опросник К. Роджерса и Р. Даймонда, рассчитывая интегральный показатель адаптации (СПА). Оценку иммунного статуса осуществляли с использованием стандартных методологических подходов системно-функциональной характеристики факторов врожденного и адаптивного иммунного ответа, содержание гормонов в сыворотке крови (тестостерон, кортизол, ТТГ, общий Т3, свободный Т4) оценивали методом ИФА. Интегральный коэффициент СПА продемонстрировал постепенное улучшение приспособляемости к академической среде: полная адаптация выявлена лишь у 40% первокурсников; у 80% третьекурсников, у 100% – на шестом курсе. Сравнение параметров иммунного статуса с референс-интервалами практически здоровых показало соответствие у всех обследованных студентов по большинству критериев. Исключение составляют данные первокурсников, где выявлено снижение числа цитолитически активных форм натуральных киллеров: % Gr⁺CD16⁺ (min-max) = 1-10; в контроле 3-15, а также уменьшение доли моноцитов, экспрессирующих на своей поверхности TLR4: CD14⁺CD284⁺ (min-max) = 5-22%, в контроле 10-25%), были отмечены статистически значимые отличия между наблюдаемыми группами в виде преобладания уровня тестостерона и трийодтиронина у студентов первого курса, тогда как показатели кортизола, тироксина и тиреотропного гормона находились на общем уровне у студентов разных курсов. Период психологической адаптации к учебному

Адрес для переписки:

Андреева Ирина Ивановна
ФГБОУ ВО «Ростовский государственный
медицинский университет»
344022, Россия, г. Ростов-на-Дону,
пер. Нахичеванский, 29.
Тел.: 8 (919) 892-47-34.
E-mail: iai3012@rambler.ru

Address for correspondence:

Irina I. Andreeva
Rostov State Medical University
29 Nakhichevansky Lane
Rostov-on-Don
344022 Russian Federation
Phone: +7 (919) 892-47-34.
E-mail: iai3012@rambler.ru

Образец цитирования:

Р.Т. Уразмамбетов, И.И. Андреева, Е.А. Антонова
«Иммунологические особенности психологической
адаптации в профессиональном образовании военных
врачей» // Российский иммунологический журнал, 2025.
Т. 28, № 3. С. 867-871.
doi: 10.46235/1028-7221-17162-IFO

© Уразмамбетов Р.Т. и соавт., 2025
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

T.A. Urazmambetov, I.I. Andreeva, E.A. Antonova
“Immunological features of psychological adaptation
in professional education of military doctors”, *Russian Journal
of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal*, 2025,
Vol. 28, no. 3, pp. 867-871.
doi: 10.46235/1028-7221-17162-IFO

© Urazmambetov T.A. et al., 2025
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.46235/1028-7221-17162-IFO

процессу в медицинском вузе менее успешен для первокурсников ВУЦ в сравнении с другими периодами наблюдения. Именно в этой группе снижены показатели иммунной системы, ответственные за процессы первичного иммунного реагирования, что формирует возможные предпосылки развития клинических проявлений иммунной дисфункции.

Ключевые слова: психонейроиммунология, психологическая адаптация, иммунная система, врожденный иммунитет, студенты

IMMUNOLOGICAL FEATURES OF PSYCHOLOGICAL ADAPTATION IN PROFESSIONAL EDUCATION OF MILITARY DOCTORS

Urazmambetov T.A., Andreeva I.I., Antonova E.A.

Rostov State Medical University, Rostov-on-Don, Russian Federation

Abstract. Adequate adaptation and functioning in a distinct environment proceed with integration of the nervous, endocrine and immune systems. Assessing the changes of immune response formed under disturbed psychoemotional state which may serve as predictors of emerging immune pathology is of particular interest. These studies may find the greatest practical application when observing a cohort of young, practically healthy adults during their professional development. The aim of our work was to reveal the adaptive resources of immune system among military medical students in the course of the educational process. The survey included students of the military training center (MTC) during their 1st (18 persons), 3rd (n = 31), and 6th academic year (n = 34), assigned to the 1st health group. Psychological testing was carried out using the method of Ch.D. Spielberger (Russian adaptation, Yu.L. Khanin) applied for differential measuring of situational and personal anxiety degree accepted as an index of resistance to stress factors. To assess the features of socio-psychological adaptation to learning environment, we used the questionnaire by K. Rogers and R. Diamond, calculating the integral adaptation index (IAI). The immune status was assessed using standard methodology in order to evaluate the systemic and functional characteristics of innate and adaptive immune response. The hormonal pattern in blood serum (testosterone, cortisol, TSH, total T3, free T4) was estimated by the ELISA method. The integral IAI coefficient reflected a gradual improvement in adaptability to the study environment. Complete adaptation was revealed only in 40% of first-year students; in 80% of third-year students, and in 100% in the sixth year. Comparison of immune parameters with reference values of practically healthy people showed compliance in all examined groups by most criteria except of the first-year students, where a decrease in the number of cytolytically active forms of natural killers was revealed: % Gr⁺CD16⁺ (min-max) = 1-10 versus 3-15 in controls, as well as a decreased proportion of TLR4-expressing monocytes: CD14⁺CD284⁺ (min-max) = 5-22%, versus 10-25% in controls). Statistically significant differences in hormone profile were noted between the observed groups, i.e., a predominance of testosterone and triiodothyronine levels in first-year students, whereas cortisol, thyroxine and thyroid-stimulating hormone levels were at similar level in students from different years. The time period of psychological adaptation to educational process at a Medical University is less successful for the first-year MTC students in comparison with other observation periods: in this group we revealed a decrease in immune indices responsible for the primary immune response, thus forming pre-requisites for the development of clinically sound immune dysfunction.

Keywords: psychoneuroimmunology, psychological adaptation, immune system, innate immunity, students

Введение

Адекватная адаптация и функционирование в определенной среде обусловлены интеграцией гомеостатических систем. Наличие связи между психоэмоциональным состоянием, социальным поведением, иммунной и эндокринной реактивностью не вызывает сомнений [4, 8]. Период обучения оказывает значительное влияние на формирование личности, поэтому проблема адекватного преодоления психоэмоциональных последствий стресса весьма актуальна [10]. Ус-

ловия адаптации студентов военных факультетов сложнее условий гражданских из-за необходимости наряду со стандартным обучением готовиться к выполнению профессиональных обязанностей военной службы [5]. Молодые люди особо чувствительны к стрессу, который в этом возрасте может привести к значительно большим негативным последствиям, чем в более позднем [1]. Так, одним из следствий хронического стресса у молодых может стать ускоренное старение иммунной системы, что представляет собой мощный фактор риска развития и прогрессирования

разнообразных вариантов иммунопатологии [9]. Выявление тех изменений в иммунной системе, которые формируются в условиях нарушения психоэмоционального состояния и могут быть использованы в качестве предикторов развития иммунопатологии, представляет особый интерес.

Цель исследования — продемонстрировать особенности адаптационных ресурсов иммунной системы военных студентов-медиков в динамике образовательного процесса.

Материалы и методы

Обследованы студенты военного учебного центра (ВУЦ) медицинского университета первого (18 человек), третьего (31) и шестого (34) курсов. Все вошедшие в группу наблюдения студенты по результатам диспансерного наблюдения не имели хронических неинфекционных заболеваний и факторов риска их развития, не нуждались в диспансерном наблюдении по поводу других заболеваний, соответствовали I группе здоровья. Критерием не включения в группы наблюдения стала острая инфекция любого генеза в течение трех месяцев, предшествовавших исследованию. Психологическое тестирование осуществляли с помощью методики Ч.Д. Спилбергера, адаптированной на русский язык Ю.Л. Ханиным, позволяющей дифференцировано измерять степень выраженности ситуативной и личностной тревожности как показатель устойчивости к стрессовым факторам [3]. Суммируя баллы, отмеченные при заполнении соответствующих анкет, делали выводы об уровне тревожности испытуемых: до 30 баллов — низкий уровень (отсутствие) тревожности, от 31 до 44 — умеренный, свыше 45 — высокий. Для выявления особенностей социально-психологической адаптации к академической среде использовали опросник К. Роджерса и Р. Даймонда, рассчитывая интегральный показатель адаптации [2]. Шкала состоит из 37 суждений, которые соответствуют критериям социально-психологической адаптированности личности. Коэффициент СПА от 0 до 38 баллов соответствует низкому уровню, в интервале 39–44 — среднему, 45–74 — высокому уровню. Оценка иммунного статуса осуществляли с использованием стандартных методологических подходов системно-функциональной характеристики факторов врожденного и адаптивного иммунного ответа [7]. Содержание гормонов в сыворотке крови (тестостерон, кортизол, ТТГ, общий Т3, свободный Т4) оценивали методом ИФА с использованием тест-систем производства ЗАО «Вектор-Бест» (Россия). Клинико-иммунологическое и психологическое тестирование в рамках проводимого исследования проводилось спустя три месяца после начала учебного года. Статистический анализ проводился с использованием программы StatTech v. 1.2.0 (разработчик — ООО «Статтех»,

Россия) и Statistica SPSS v. 26. Количественные показатели оценивались на предмет соответствия нормальному распределению с помощью критерия Шапиро–Уилка. Количественные показатели, имеющие нормальное распределение, описывались с помощью средних арифметических величин (M) и стандартных отклонений (SD), границ 95% доверительного интервала (95% ДИ). В случае отсутствия нормального распределения количественные данные описывались с помощью медианы (Me) и нижнего и верхнего квартилей ($Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$). Сравнение групп по количественному показателю, распределение которого отличалось от нормального, выполнялось с помощью критерия Краскела–Уоллиса, апостериорные сравнения — с помощью критерия Данна с поправкой Холма.

Результаты и обсуждение

Анализ результатов психологического анкетирования первокурсников показал, что состояние повышенной ситуативной и личностной тревожности демонстрировал 61% респондентов, при этом более значимая тревога определялась ситуацией: 22% отметили высокую ситуативную тревожность, тогда как личностную — только 6%, более половины первокурсников (56%) не достигли показателей высокой социально-психологической адаптации. Результаты иммунологического обследования с определением основных количественных и функциональных показателей иммунного ответа не зафиксировали статистически значимых отклонений средних значений от референсных параметров, принятых при оценке иммунного статуса взрослых [6]. Однако при сравнении ряда показателей врожденного иммунного ответа в исследуемой выборке отмечался выход за пределы общепризнанного референс-интервала. Так, выявлено снижение минимального значения количества цитолитически активных форм натуральных киллеров: % $CD3^+CD16^+Gr^+$ (min-max) первокурсников определен в рамках 1–10; тогда как референсный интервал составляет 3–15%. Также отмечены испытуемые, у которых нижняя граница доли моноцитов, экспрессирующих на своей поверхности TLR4, вдвое ниже соответствующего референсного критерия: $CD14^+CD284^+$ (min-max) в группе равен 5–22%, референс-интервал — 10–25%. Кроме того, в ряде случаев регистрировалось снижение показателя адаптационных ресурсов нейтрофильного фагоцитоза — коэффициент стимуляции НСТ-теста первокурсников варьировал в пределах 1,5–1,9 у. е., тогда как референсный интервал min-max равен 1,7–2,2 у. е.

Анализ результатов психологического анкетирования с использованием шкал тревожности на третьем курсе обучения показал доминирование средней степени как ситуативной (87%), так

и личностной (80%) тревожности, что отражает преобладание оптимальной степени психоэмоционального состояния. Также 80% студентов третьего курса продемонстрировали максимально сформированную социально-психологическую адаптацию. Сопоставление результатов оценки параметров врожденного и адаптивного иммунного ответа в исследуемой группе студентов ВУЦ со среднестатистическими показателями практически здоровых взрослых не зафиксировали отклонений от референсных значений по доминирующему большинству показателей. Отличия касаются характеристик лимфоцитов врожденного иммунитета. Зафиксированы максимальные значения абсолютного содержания количества и функционально активных форм натуральных киллеров, превышающие верхний порог референсного интервала: CD3⁺CD16⁺ (abs.) в группе — 0,10-0,38 × 10⁹/л, в контроле — 0,12-0,37 × 10⁹/л; CD3⁺CD16⁺Gr⁺ (abs.) в группе — 0,05-0,33 × 10⁹/л, в контроле — 0,04-0,30 × 10⁹/л.

Анализ данных результатов психологического анкетирования студентов выпускного курса показал, что большая доля испытуемых в данной группе оценили ситуативную тревожность по среднему уровню (55%), 22% респондентов — по высокому. Психологическое состояние, отражающее качество личности, документирует либо отсутствие тревожности (38%), либо ее умеренную выраженность (62%). Результаты анкетирования на предмет оценки степени социально-психологической адаптации выявили, что все входящие в группу наблюдения шестикурсники характеризуются

полной или высокой степенью адаптации. Изучение данных сопоставления иммунологического обследования шестикурсников ВУЦ с референсными значениями иммунного статуса здоровых взрослых не зафиксировали отклонения ни по одному из параметров, отражающих количественный и функциональный потенциал факторов врожденного и адаптивного иммунного ответа.

Следует отметить, что при анализе ряда параметров эндокринного статуса отмечено, что все показатели общей группы испытуемых находились в пределах референсных значений, характерных для здоровых взрослых. Между тем при сопоставительной характеристике были отмечены статистически значимые отличия между наблюдаемыми группами в виде преобладания уровня тестостерона и трийодтиронина у студентов первого курса, тогда как показатели кортизола, тироксина и тиреотропного гормона находились на общем уровне у студентов разных курсов (табл. 1).

Совокупность представленных данных свидетельствует, что у первокурсников в условиях минимальных значений показателя социально-психологической адаптивности регистрируется максимальная активация гормонального спектра по отношению к другим периодам обучения. При этом только на первом курсе у студентов ВУЦ выявлены изменения иммунного реагирования в виде снижения потенций натуральных киллеров, нейтрофильного фагоцитоза, моноцитарной экспрессии Toll-подобного рецептора 4.

ТАБЛИЦА 1. СОПОСТАВИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПАРАМЕТРОВ ЭНДОКРИННОЙ СИСТЕМЫ СТУДЕНТОВ РАЗНЫХ ЭТАПОВ ОБУЧЕНИЯ, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 1. COMPARATIVE CHARACTERISTICS OF THE PARAMETERS OF THE ENDOCRINE SYSTEM OF STUDENTS AT DIFFERENT STAGES OF STUDY, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

Показатели Indicators	1-й курс 1 st year	3-й курс 3 rd year	6-й курс 6 th year	p
Тестостерон (нмоль/л) Testosterone (nmol/L)	26,9 (20,34-29,43)	17,3 (15,98-21,83)	15,5 (11,72-18,68)	p _{1,3} = 0,029* p _{3,6} = 0,081 p _{1,6} = 0,001*
Кортизол (нмоль/л) Cortisol (nmol/L)	431,80 (355,15-477,00)	389,10 (333,30-453,90)	424,10 (344,55-485,90)	p _{1,3} = 0,254 p _{3,6} = 0,419 p _{1,6} = 0,694
Т3 (нмоль/л) T3 (nmol/L)	1,4 (1,344-1,536)	1,35 (1,205-1,434)	1,189 (1,146-1,326)	p _{1,3} = 0,061 p _{3,6} = 0,037* p _{1,6} = 0,001*
Т4 (пмоль/л) T4 (pmol/L)	13,11 (12,28-14,50)	13,37 (12,84-14,45)	13,46 (12,55-14,25)	p _{1,3} = 0,678 p _{3,6} = 0,885 p _{1,6} = 0,787
ТТГ (мкМЕ/мл) TSH (μIU/mL)	2,92 (1,803-3,494)	2,47 (1,864-3,026)	2,79 (1,622-3,449)	p _{1,3} = 0,781 p _{3,6} = 0,686 p _{1,6} = 0,479

Примечание. * — различия статистически значимы при p < 0,05 согласно критерию Манна–Уитни.

Note. *, differences are statistically significant at p < 0.05 according to the Mann–Whitney test.

Выводы

Период психологической адаптации к учебному процессу в медицинском вузе менее успешен для первокурсников ВУЗ в сравнении с другими этапами обучения.

У студентов первого курса снижены показатели иммунной системы, ответственные за про-

цессы первичного иммунного реагирования, что формирует возможные предпосылки развития клинических проявлений иммунной дисфункции.

Необходима разработка мероприятий, способствующих оптимизации психологической и иммунологической адаптации первокурсников.

Список литературы / References

1. Немец В.В., Виноградова Е.П. Стресс и стратегии поведения // Национальный психологический журнал, 2017. Т. 26, № 2. С. 59-72. [Nemets V.V., Vinogradova E.P. Stress and behavior strategies. *Natsionalnyy psikhologicheskii zhurnal* = *National Psychological Journal*, 2017, Vol. 26, no. 2, pp. 59-72. (In Russ.)]
2. Осницкий А.К. Определение характеристик социальной адаптации // Психология и школа, 2004. № 1. С. 43-56. [Osnitsky A.K. Definition of characteristics of social adaptation. *Psikhologiya i shkola* = *Psychology and School*, 2004, no. 1, pp. 43-56. (In Russ.)]
3. Прохоров О.А. Практикум по психологии состояний: учебное пособие. СПб.: Речь, 2004. 480 с. [Prokhorov O.A. Practical training in the psychology of states: a teaching aid]. St. Petersburg: Rech, 2004. 480 p.
4. Самиотруева М.А., Ясенявская А.Л., Цибизова А.А. Нейроиммуноэндокринология: современные представления о молекулярных механизмах // Иммунология, 2017. Т. 38, № 1. С. 49-59. [Samotruева M.A., Yasyenyavskaya A.L., Tsibizova A.A. Neuroimmunoendocrinology: modern concepts of molecular mechanisms. *Immunologiya* = *Immunology*, 2017, Vol. 38, no. 1, pp. 49-59. (In Russ.)]
5. Тананакина Т.П., Лысенко Е.А., Паринов Р.А. Оценка адаптационных возможностей юношей студентов медицинского вуза, обучающихся в разных социально-экономических условиях // Биология и интегративная медицина, 2021. № 6 (53). С. 341-349. [Tananakina T.P., Lysenko E.A., Parinov R.A. Assessment of the adaptive capabilities of young male students of a medical university studying in different socio-economic conditions. *Biologiya i integrativnaya meditsina* = *Biology and Integrative Medicine*, 2021, no. 6 (53), pp. 341-349. (In Russ.)]
6. 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» // Медицинская иммунология, 2012. Т. 14, № 3. С. 255-268. [Khaidukov S.V., Baidun L.A., Zurochka A.V., Totolyan A.A. Standardized technology "Study of the subpopulation composition of peripheral blood lymphocytes using flow cytometer analyzers". *Meditsinskaya immunologiya* = *Medical Immunology (Russia)*, 2012, Vol. 14, no. 3, pp. 255-268. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2012-3-255-268.
7. Хаитов Р.М., Пинегин Б.В. Оценка иммунного статуса человека в норме и патологии // Иммунология, 2001. № 4. С. 4-6. [Khaitov R.M., Pinegin B.V. Assessment of human immune status in health and disease. *Immunologiya* = *Immunology*, 2001, no. 4, pp. 4-6. (In Russ.)]
8. Bower J.E., Kuhlman K.R. Psychoneuroimmunology: An introduction to immune-to-brain communication and its implications for clinical psychology. *Annu. Rev. Clin. Psychol.*, 2023, Vol. 19, pp. 331-359.
9. de Punder K., Heim C., Wadhwa P.D., Entringe S. Stress and immunosenescence: The role of telomerase. *Psychoneuroendocrinology*, 2019, Vol. 101, pp. 87-100.
10. Weber A., Weber B., Delpont S. Preparing undergraduate student paramedics to consider their mental health during clinical placement in Australia. *Australas. Emerg. Care*, 2023, Vol. 26, no. 4, pp. 341-345.

Авторы:

Уразмамбетов Р.Т. — преподаватель кафедры безопасности жизнедеятельности и медицины катастроф ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Ростов-на-Дону, Россия

Андреева И.И. — д.м.н., доцент, профессор кафедры клинической иммунологии и аллергологии ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Ростов-на-Дону, Россия

Антонова Е.А. — к.б.н., научный сотрудник Научно-исследовательского института клинической иммунологии ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Ростов-на-Дону, Россия

Authors:

Urazmambetov R.T., Lecturer, Department of Life Safety and Disaster Medicine, Rostov State Medical University, Rostov-on-Don, Russian Federation

Andreeva I.I., PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Professor, Department of Clinical Immunology and Allergology, Rostov State Medical University, Rostov-on-Don, Russian Federation

Antonova E.A., PhD (Biology), Researcher, Research Institute of Clinical Immunology, Rostov State Medical University, Rostov-on-Don, Russian Federation

Поступила 28.03.2025

Отправлена на доработку 07.04.2025

Принята к печати 25.05.2025

Received 28.03.2025

Revision received 07.04.2025

Accepted 25.05.2025

КОЗЛОВ ВЛАДИМИР АЛЕКСАНДРОВИЧ (К 85-ЛЕТИЮ СО ДНЯ РОЖДЕНИЯ)



Фото Игоря Парфенова

20 июля 2025 года исполнилось 85 лет со дня рождения Владимира Александровича Козлова — одного из крупнейших советских и российских иммунологов, академика Российской академии наук, профессора, доктора медицинских наук, заведующего кафедрой клинической иммунологии Новосибирского государственного медицинского университета, научного руководителя Научно-исследовательского института фундаментальной и клинической иммунологии (НИИФКИ), заведующего лабораторией клинической иммунопатологии этого же института.

Владимир Александрович родился в городе Новосибирске. В 1963 году окончил Новосибирский государственный медицинский институт. С 1963 года он последовательно прошел путь ординатора, аспиранта, младшего и старшего научного сотрудника, заведующего лабораторией, заместителя директора по научной работе, директора института, заместителя председателя Сибирского отделения Российской академии медицинских наук.

В 1969 году Владимир Александрович защитил диссертацию на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по теме «Постэмбриональные и пострadiaционные сдвиги в иммунокомпетентной ткани животных разных генотипов», в 1981 году им была защищена докторская диссертация на тему «Гуморально-клеточные уровни регуляции основных этапов антителогенеза».

В 1986 году Владимиру Александровичу было присвоено звание «профессор» по специальности «аллергология и иммунология», в 1994 году избран членом-корреспондентом Российской академии медицинских наук (РАМН) по специальности «иммунология», в 2002 году — действительным членом (академиком) РАМН по специальности «иммунология».

Важнейшими трудовыми достижениями Владимира Александровича являются многолетние масштабные комплексные исследования по следующим направлениям:

- молекулярно-генетические основы регуляции процессов дифференцировки, активации и пролиферации клеток иммунной системы;
- интегративная роль иммунной системы во взаимодействии с основными регуляторными системами организма;
- клеточные и молекулярно-генетические механизмы формирования иммунопатологических состояний при развитии основных заболеваний человека.

С именем В.А. Козлова связано развитие фундаментальных исследований в области регуляции иммунного гомеостаза во взаимодействии с нервной, эндокринной и кроветворной системами в норме и патологии.

Владимир Александрович внес большой вклад в развитие экспериментальной иммунологии. Им были выявлены разнонаправленные конкурентные механизмы регуляции пролиферации и дифференцировки стволовых кроветворных клеток, а также впервые в мире выдвинута и обоснована гипотеза об участии полипотентных стволовых кроветворных клеток в формировании иммунного ответа.

Впервые в мире В.А. Козловым с сотрудниками описаны иммунорегуляторные функции эритроидных клеток. По результатам этих исследований в 1990 году Госкомитетом СССР по делам изобретений зарегистрировано открытие «Явление регуляции гуморального иммунного ответа гетерогенной популяцией клеток эритроидного ряда». Впоследствии из эритробластов был выделен иммунодепрессивный фактор, обладающий ингибирующим эффектом на пролиферацию В-лимфоцитов.

Под руководством В.А. Козлова разработан новый иммуноактивный препарат, не имеющий аналогов в России и за рубежом, — Нб (цепь гемоглобина) со свойствами модулятора эритро- и иммунопоэза. Обоснована возможность применения нового ингибитора пролиферации стволовых кроветворных клеток (Нбβ, а также входящего в его состав пептида PN951) в качестве химиопротекторного средства.

В последние десятилетия под руководством В.А. Козлова инициированы и успешно ведутся до настоящего времени работы по созданию принципиально нового класса препаратов для лечения основных заболеваний человека на основе биомедицинских клеточных продуктов. Среди наиболее перспективных разработок можно отметить: клеточные продукты на основе генно-модифицированных Т-клеток для терапии онкологических заболеваний (CAR-T, TCR-T, TCR-подобные CAR-T клетки); дендритно-клеточные вакцины в лечении онкологических, инфекционных и аутоиммунных заболеваний; M2-макрофаги и секретируемые ими продукты в лечении нейропатологии и психоневрологических расстройств; Т-клеточные вакцины в лечении аллергических и аутоиммунных заболеваний; стволовые клетки костного мозга в лечении цирроза печени, травматических повреждений спинного и головного мозга, ишемии нижних конечностей.

Можно сказать, что именно благодаря идейному руководству Владимира Александровича фундаментальные и прикладные разработки в области клеточных технологий стали визитной карточкой НИИФКИ, а Клиника иммунопатологии — единственным в Сибири клиническим учреждением, специализирующимся на лечении больных с нарушениями функций иммунной системы, в том числе и с помощью внедренных методов иммунотерапии.

Одним из направлений деятельности института является проведение, поисковых и прикладных исследований, направленных на развитие новых методов иммунодиагностики, иммунопрофилактики и иммунотерапии. В связи с распространением коронавирусной инфекции COVID-19, вызванной SARS-CoV-2, которая стала одним из самых значительных вызовов не только для здравоохранения, но и для научных учреждений страны, при кураторстве В.А. Козлова в НИИФКИ был разработан и запатентован новый способ лечения и реабилитации пациентов с хроническими постковидными нарушениями обоняния, основанный на интраназальном введении пациентами секреторных факторов собственных макрофагов. Данный подход позволил восстановить обоняние у пациентов с продолжительностью такого вида расстройств более 12 месяцев.

В.А. Козлов обогатил науку новыми представлениями о закономерностях функционирования иммунной системы как целостного образования. Системный подход позволил получить ряд уникальных данных о механизмах иммунорегулирующего действия гормонов, нейромедиаторов и нейропептидов, о механизмах нейроэндокринной регуляции функций макрофагов. Его неутомимая энергия и жажда новых идей позволяет развивать направления и воплощать перспективные проекты. Одним из таковых в последние годы является изучение тимуса и основ его функционирования на протяжении всей жизни человека. В основу новой концепции академика положен тот факт, что тимус выступает не только инициатором иммунопатогенеза аутоиммунных и онкологических заболеваний, но и пролонгатором инфекционных болезней, аллергических и других состояний организма, особое место в которых занимает процесс старения. Владимир Александрович ставит тимус как центральный орган иммунной системы во главу угла, делая акцент на необходимости лечения не «периферии» иммунной

системы, а ее «центра» — тимуса. Если мы этому научимся, то можно будет подумать не только о лечении, но и излечении многих заболеваний.

Под руководством В.А. Козлова сформировалась школа высококвалифицированных исследователей в области иммунологии. Им подготовлено более 70 докторов и кандидатов наук. В течение ряда лет В.А. Козлов является председателем защитного диссертационного совета 24.1.184.01 (Д 001.001. XX) по специальности 3.2.7. Иммунология; главным редактором журналов «Клеточная трансплантология и тканевая инженерия» и «Традиционная медицина. Восток и Запад», заместителем главного редактора журнала «Цитокины и воспаление», членом редакционных коллегий журналов «Бюллетень СО РАМН», «Медицинская иммунология» (Санкт-Петербург), «Аллергология и иммунология», «Клеточные технологии в биологии и медицине», членом редакционного совета журнала «Российский иммунологический журнал» (Москва), членом редакционного совета журнала «Иммунология» (Москва).

В.А. Козлов является почетным вице-президентом Российского научного общества иммунологов (РНОИ), президентом Ассоциации специалистов клинических иммунологов и клеточных технологов, вице-президентом Education Instruction Committee of World Federation of Chinese Medicine Societies, почетным членом The World Immunopathology Organization (WIPO), приглашенным профессором в Тяньцзиньском университете традиционной китайской медицины.

Огромны заслуги В.А. Козлова в преподавании иммунологии и усилиях выделить иммунологию в самостоятельную научную дисциплину. Он является заведующим кафедрой иммунологии ФМПЗ ИМТ Новосибирского государственного университета (НГУ) и инициатором создания курсов «Иммунология» и «Клеточные технологии» в этом университете.

В.А. Козлов — автор и соавтор более 1250 научных публикаций, в том числе 15 монографий, 7 руководств и учебников. Им получено 36 патентов, 9 авторских свидетельств, 1 диплом на открытие.

Владимир Александрович удостоен премии РАМН им. Н.И. Пирогова, почетного знака им. акад. РАМН В.И. Иоффе; является кавалером золотого почетного знака «Общественное признание»; ему присвоено почетное звание «заслуженный ветеран Сибирского отделения РАН»; награжден золотой медалью Российского научного общества иммунологов, государственной премией Правительства Российской Федерации в области образования, знаком отличия «За заслуги перед Новосибирской областью» и знаком «Отличник здравоохранения».

В эти юбилейные дни все иммунологи России присоединяются к многочисленным поздравлениям в адрес академика В.А. Козлова и желают ему творческого долголетия и активной работы на благо клинической и фундаментальной иммунологии.

Абакумова Т.В.	797	Верховская М.Д.	695	Заморина С.А.	533
Абаленихина Ю.В.	681	Власова В.В.	573	Зборовская И.А.	765
Аббасова В.С.	757	Волкова Н.В.	567	Здзитовецкий Д.Э.	659
Абишева Н.Н.	449	Волосникова Е.А.	567	Зильбер К.Ю.	495
Абрамова Т.Я.	757	Гаврилова Т.В.	837	Зиновьева Н.В.	631
Авруцкая В.В.	619	Гаева А.И.	605	Злобина А.П.	403
Адамчик А.И.	585	Газиев А.Р.	725	Зотова А.В.	719
Адилов М.М.	659	Гайворонский С.И.	567	Зудова А.И.	495
Актанова А.А.	805	Галеева Е.В.	631	Зурочка А.В.	687
Акулов А.П.	403	Гейн С.В.	409	Зурочка В.А.	687
Александров А.В.	765	Генинг С.О.	797	Зырянова К.С.	725
Александрова Н.В.	791	Генинг Т.П.	797	Ибатуллин М.В.	409
Александров В.А.	765	Гетте И.Ф.	481	Иванова Е.В.	475
Алешина Г.М.	561	Гизингер О.А.	725	Иванов П.В.	443
Альтман Д.Ш.	785	Гильдеева Г.Н.	631	Иванюк М.М.	829
Ангельская О.А.	757	Глебездина Н.С.	369	Исаев П.Ю.	639
Андреева В.О.	619	Гольдерова А.С.	509	Кабалык М.А.	829
Андреева И.И.	867	Горбачева Н.Н.	645	Кабина Н.А.	811
Аникеева Н.А.	681	Горбунова О.Л.	591	Кадочникова П.А.	605
Анисимова Е.Н.	659	Гордова В.С.	529	Казачков Е.Л.	625
Антонеева И.И.	797	Гороховская П.В.	829	Калинина О.В.	611
Антонова Е.А.	867	Григорьева Е.А.	529	Калинин С.А.	847
Апанович С.В.	495	Гриценко В.А.	667	Каплина А.В.	611
Арискина О.Б.	651	Громов М.И.	651	Карал-оглы Д.Д.	403
Арташян О.С.	547	Гусев А.В.	673	Карташова О.Л.	421
Афонин М.Б.	553	Гусев Е.Ю.	751	Катаева Н.Н.	855
Ахметьянов Р.Р.	779	Давыдова Е.В.	837	Климов А.В.	639
Байдина Т.В.	375	Давыдова Н.В.	631	Климов В.В.	639
Баркова Е.П.	719	Данилова И.Г.	431	Клоц И.Н.	403
Барышникова Н.В.	393	Данченко И.Ю.	375	Кобелев Ю.Г.	431
Бедулева Л.В.	437	Демидов О.Н.	501	Козлов В.А.	805
Белошангин А.С.	725	Демидов С.Д.	855	Козлов И.Г.	631
Белых Н.А.	681	Демко А.Е.	651	Колесникова Л.И.	773
Бельды Е.С.	829	Денисов А.А.	639	Колосова Е.Д.	501
Бердюгина О.В.	355	Денисова В.В.	805	Колупаев В.А.	861
Блинова Е.А.	757	Добрынина М.А.	703	Кольберг Н.А.	431
Бобров М.Ю.	553	Долгих М.Д.	533	Конашов А.Г.	673
Богданова Д.А.	501	Долгова Д.Р.	797	Конашов В.А.	673
Боева О.С.	757	Долматова Л.С.	521	Коньшина А.В.	817
Бойко М.С.	673	Дондокова О.Э.	829	Коняшин М.В.	597
Борисевич В.И.	757	Дятлова А.С.	515	Коркмазов А.М.	625
Борисенок А.И.	393	Егоров А.Н.	509	Корнова Н.В.	725
Борисов А.Г.	659	Емельянов Н.И.	765	Королев М.А.	757
Борисова Т.А.	631	Ермолова Н.В.	619	Королевская Л.Б.	425
Борисов Р.Н.	659	Ершов Я.Д.	791	Костарева А.А.	611
Бочкова М.С.	533	Есина Т.И.	567	Костоломова Е.Г.	393
Брындина И.Г.	469	Жаркова М.С.	515	Котова Н.В.	861
Бурак М.Ю.	553	Жердева П.Е.	731	Кравченко Л.В.	619
Бурханова Е.В.	797	Жукова Д.С.	403	Красильников А.Н.	791
Быкова М.В.	805	Жулева А.Ю.	681	Краскевич Д.А.	719
Быстрицкая Е.П.	847	Журавлёва Ю.А.	751	Крицкий И.С.	687
Быстров А.М.	837	Забокрицкий Н.А.	399	Крукиер И.И.	619
Васева Е.М.	393	Загрешенко Д.С.	639	Кряжевских А.В.	449
Верхова С.С.	381	Зайкова Е.К.	611	Кудрявцев И.В.	743

Кузнецов А.А.	837	Пашкова Т.М.	673	Снигирев А.Я.	737
Кузьмин М.Д.	421	Пашнин С.Л.	785	Снимщикова И.А.	817
Кузьмичева Н.А.	541	Первунина Т.М.	611	Соколова К.В.	461
Куклина Е.М.	375	Петричук С.В.	597	Соколова Л.А.	751
Кулагова Т.А.	381	Петрова Н.А.	611	Соломатина Л.В.	495
Купцова Д.Г.	597	Петрова Ю.В.	631	Среднева Л.А.	455
Курбатова О.В.	597	Печенкина М.А.	487	Старикова Э.А.	743
Курочкина Ю.Д.	757	Пивоварова Л.П.	651	Сударикова Е.В.	631
Курчина Е.Р.	791	Плехова Н.Г.	829	Султанова Т.Р.	455
Кухарев Я.В.	639	Полюдова Т.В.	409	Сухих А.А.	403
Лазарев С.С.	533	Полякова Ю.В.	791	Сычев И.В.	585
Лапштаева А.В.	585	Пономарева В.Н.	573	Тарасенко С.В.	847
Лебедев В.М.	743	Попова Л.П.	421	Терентьев А.С.	443
Левкович М.А.	619	Потапов А.С.	597	Терентьева О.С.	437
Ленгина М.А.	625	Приходько Ю.С.	393	Терещенко В.П.	403
Лисица Д.А.	501	Пронкина Н.В.	805	Терещенко С.Ю.	645
Логинова О.А.	387	Просекова Е.В.	829	Тимганова В.П.	533
Малишевская О.И.	393	Протопопов В.А.	469	Титова С.А.	481
Малькова В.М.	651	Радыгина Т.В.	597	Тонкушина М.О.	481
Маммедова Дж.Т.	743	Раев М.Б.	533	Топтыгина А.П.	731
Маркелова Е.В.	651	Рар А.А.	567	Туканов Д.А.	461
Марченко В.С.	695	Ревакина М.О.	811	Турянская Ю.В.	751
Масленникова И.Л.	415	Рубинштейн А.А.	579	Уразмамбетов Р.Т.	867
Медведева Ю.А.	625	Рудель А.Е.	515	Уразова О.И.	639
Меликян А.Г.	855	Рыбакова А.Д.	757	Уракова М.А.	469
Меньшикова Д.И.	437	Рыбцов С.А.	403	Усанина Д.И.	533
Меньшиков И.В.	737	Рыжкова А.Ю.	639	Филатенкова Т.А.	561
Михайлова И.В.	475	Рысева А.А.	651	Филиппова Ю.В.	541
Мишурун Я.В.	495	Рябова Л.В.	823	Фисенко А.П.	597
Мкртчян И.Г.	855	Сабириянов А.Р.	779	Фомина К.В.	437
Мовсисян Г.Б.	597	Сабыныч В.А.	829	Фрейдлин Е.В.	597
Мосунов А.А.	711	Савченко А.А.	659	Фролова О.М.	743
Мухлынина Е.А.	431	Садек Али	487	Храмова Т.В.	737
Мягдиева И.Р.	797	Сайдакова Е.В.	363	Храмцова Ю.С.	487
Нагиева Ф.Г.	719	Сарапульцев А.П.	687	Худякова М.И.	639
Некрасова И.В.	387	Сарапульцев Г.П.	823	Цветов Н.В.	829
Никитин В.С.	553	Саркисян Н.Г.	855	Чайникова И.Н.	475
Никифоров Н.Г.	381	Сафронова Э.А.	823	Черепанов И.С.	443
Николенко М.В.	393	Сашенков С.Л.	861	Черешнева М.В.	837
Овчаренко Е.В.	639	Свитич О.А.	719, 847	Чистякова Г.Н.	605
Овчинина Н.Г.	469	Севостьянова Ю.Н.	631	Шакирова К.П.	605
Огарков О.Б.	773	Секунов А.В.	469	Ширшев С.В.	591
Омельченко В.О.	757	Селезнёва О.А.	639	Шкатова А.Н.	639
Орехов А.Н.	381	Семикина Е.Л.	597, 731	Шмагель К.В.	425
Орлова Е.Г.	387	Сергеева В.Е.	529	Шустов М.В.	561
Орлова Е.А.	773	Сивкова Д.С.	393	Щербаков Д.Н.	567
Осиков М.В.	673	Сивордова Л.Е.	791	Эрдынеева Д.Б.	381
Осипова И.В.	651	Сидоров А.Ю.	443	Юшков Д.П.	437
Осипова И.М.	855	Симакова О.В.	567	Ярема О.П.	547
Остроушко А.А.	481	Синеговец А.А.	475		
Паринская Е.С.	681	Скачков И.П.	805		
Парфентьева Т.М.	711	Смольникова М.В.	645		
Пашинина О.А.	673	Смолягин А.И.	541		
Пашкина Е.А.	509, 805	Смородченко А.Т.	529		

абдоминальный сепсис	673	гуморальный иммунитет	774	лимфоциты	496, 598, 726, 824, 830
авидин-позитивные клетки	529	гуморальный иммунный ответ	567	липополисахарид	382
адьюванты	567	дважды позитивные Т-клетки	579	макака яванская	403
активация тучных клеток	488	девочки-подростки	620	макрофагальный	
активность	766	дегрануляция	488	колониестимулирующий фактор	586
аллоантитела	738	дентальные имплантаты	848	макрофаги	382, 410
аллоксановый диабет	456	дети	598, 645, 681	мальнутриция	830
анализатор Seahorse XF	574	дифференцировка Т-клеток	579	маркеры окислительного стресса	542
анализ данных	356	живая аттенуированная вакцина	720	масло кориандра	394
антимикробные пептиды .. 410, 515, 562		живая вакцина	720	масс-спектрометрия	553
антиоксиданты	456	жизнеспособность	534	машинное обучение	356
антитела	687, 726	изофлавоны	462	меланома	510
антицитокиновая активность .. 421, 668		иммунитет	605, 626, 687, 696, 726	мелатонин	369, 376
апоптоз	592	иммунная система	605, 704, 824, 868	метаболизм	574
артрогенное мышечное торможение .. 780		иммунные клетки	496, 574	метаболиты	394
асцит	515	иммунный ответ	720	метаболический синдром	470
аутоантитела	444, 738	иммунодефицит	432	метабономика	553
аутоиммунные заболевания	758	иммунологические показатели	542	метотрексат	476
аутологичные лимфоциты	450	иммунология	356, 496	миграция	660
аутоотрансплантация	450	иммунорегуляция	444	миелограмма	482
аффинность связывания	369	иммуностарение	830	микробиота легких	774
ацетаминофен	496	иммуноферментный анализ	687	микроргия	553
бактерицидная активность		индуцированная беременность	586	микроРНК-451a	612
нейтрофилов	712	интерлейкины	394	миокины	780
бациллы	400	интраназальная иммунизация	567	митохондрии	574
белок A <i>Staphylococcus aureus</i>	567	инфаркт миокарда	811, 818	множественная миелома	806
беременность	388, 592	инфекция	652	молекулярные мишени	369
биологические активные вещества .. 400		инфекция SARS-CoV-2	704	моноклеары	416
биомаркеры	612, 681	инфламеджинг	830	моноклеары периферической	
биоорганокмплес Бурсанатал	432	искусственный интеллект	356	крови человека	476
биоупленки UPEC	416	исход	673	моноциты	382, 394, 592, 660
биосовместимость	534	ишемическая болезнь сердца .. 811, 818		морфометрия	482
биохимические показатели	403, 542	кандидоз	856	МПО	416
болезнь Гоше	598	карцинома Эрлиха	515	MT1	376
бронхиальная астма	640, 645	катепсин G	416	MT2	376
ВГЧ-6	696	кератоластика	838	мукозальные вакцины	567
вейп	548	кинурунин	786	мукозальный иммунитет	848
вестибулопластика	848	кислород-зависимый метаболизм .. 673		мультиплексный анализ	645
вирус SARS-CoV-2	696	кисспептин-54	592	мышы	515
вирус ветряной оспы	720	кишечные палочки	421	мышы C57Bl/6	432
вирусная пневмония	704	клевер	476	наивные клетки	363, 830
вирус Эпштейна–Барр	712	клетки памяти	363, 830	недоношенные новорожденные	605
ВИЧ	738	клеточная линия B16	510	нейровоспаление	553
внебольничная пневмония	681	клеточный иммунитет	400, 732	нейтрофилы	410, 416, 592, 673
воспаление	382, 605, 652	клеточный цикл	363	нейтрофильные гранулоциты	652
время без прогрессирования	798	колониестимулирующий фактор-1 .. 586		некротизирующий энтероколит	612
врожденные пороки сердца	612	колоректальный рак	502	низин	410
врожденный иммунитет	868	коморбидность	640	низкоэнергетические переломы	792
гематологические показатели	403	компьютерная томография	704	НСТ	696
гемобластозы	806	конденсат выдыхаемого воздуха	645	НСТ-активность нейтрофилов	862
гемопоз	403	корь	726	общий анализ крови	456
гемопоэтическая стволовая клетка .. 806		костный мозг	482	ожирение	620
гепарин	529	кремний	529	окислительное фосфорилирование .. 574	
гепатопикты	400	кривые выживаемости	515	оксидативный стресс	462
гепатопротекторы	400	криоконсервация	426	олигоменорея	620
герпес 6-го типа	696	кровь	838	остеопороз	792
гетерологичные лимфоциты	450	круглогодичный аллергический		острый коронарный синдром	824
гипер-IgE-синдром	632	ринит	640	острый лимфобластный лейкоз	806
гипергликемия	470, 752	крысы	542	острый миелоидный лейкоз	806
гиперкоагуляция	752	ксенотрансплантация	450	острый панкреатит	652, 660
гиперплазия протокового эпителия .. 438		культивирование <i>in vitro</i>	534	острый токсический гепатит	400
гипоксия	553	курение	548	отравление	496
гипоталамус	562	лазер	848	парацетамол	496
гликолиз	574	лантибиотики	410	пептид ZP2	668
голотурии	522	легкие	548, 605	первичные иммунодефициты	856
грамотрицательные бактерии	668	лейкоциты	482	периферическая кровь	403
гранулоцитарно-макрофагальный		лимфаденит челюстно-лицевой		печень	462
колониестимулирующий фактор	522	области	856	пищевая сенсibilизация	640
		лимфоцитопения	438, 444		

пищевые аллергены	640	системное воспаление.....	752	В-лимфоциты памяти	
плазмоциты	626	системный иммуновоспалительный		непереключенные	632
повреждение передней		индекс	766	В-лимфоциты памяти	
крестообразной связи	780	слюнные железы.....	438	переключенные	632
поглощение наночастиц	534	смешанная культура лимфоцитов	450	C57Black/6	510
поли-L-аргинин	410	созревание Т-клеток	579, 744	С-реактивный белок	766
полиморфизм CSF1R.....	586	СОЭ	766	CD-лимфоциты	862
полиоксометаллаты.....	482	сперматогенез.....	488	CD4	738
полипозный риносинусит.....	626	специфические антитела sIgE.....	640	CD4 ⁺ CD8 ⁺ Т-клетки	579
поляризация Т-клеток	744	СПИД	738	CD4 ⁺ Т-лимфоциты	363
послеоперационные осложнения.....	668	старение	403, 456	CD8 ⁺ клетки	732
постковидный синдром	696, 704, 712	стафилококки	421	CD8 ⁺ Т-клетки	744
постменопауза	792	стентирование коронарных		CD8 ⁺ Т-лимфоциты	363
посттравматическое стрессовое		артерий	824	CD63	811
расстройство	786	стоматит	856	CD81	811
предиабет	752	стресс-протекторы	542	<i>Corynebacterium kefirresidentii</i>	774
прекультивирование (отдых)	426	стресс	562	COVID-19	687, 696, 824
пренатальное табакокурение	542	студенты	868	CSF1	586
препарат КК1	542	субпопуляция	660	DAS28	766
придадок семенника	488	тестостерон	470	<i>E.coli</i>	416
прикрепленная кератинизированная		тетраспанины	811	ELISpot	732
слизистая оболочка	848	тимоциты	388	FRAX.....	792
пробиотик	400	тимус	482	GPT	356
провоспалительные		толерантность.....	382	HHV-6	696
цитокины	620, 786, 792, 848	триптофан	786	IFN γ	732
пролиферация	426	туберкулез	774	IL-1b	502
противовоспалительные препараты.....	456	тучные клетки.....	488, 529, 548	IL-6	681, 818
противоопухолевая активность	515	фагоцитоз	410, 592, 673, 696	IL-8	502, 612, 681, 798
проточная цитометрия.....	363, 426, 579, 744	фагоцитоз нейтрофилов.....	712, 862	IL-13	645
проточная цитометрия		фагоциты	522	IL-17A	645
с визуализацией	598	фактор транскрипции NF- κ B	598	IL6ST	632
проточная цитофлуориметрия.....	438	ферментозаместительная терапия.....	598	iNKT	388
профилирование метаболитов.....	553	ферменты.....	369	KREC	824
психологическая адаптация	868	физическая нагрузка	862	LPS	382
психонейроиммунология.....	868	фитоэкстракт	476	M-CSF	612
псориаз	758	фуллеренол C ₆₀ (OH) ₂₂₋₂₄	534	NF- κ B	502, 470
псориатический артрит.....	758	хейлит	856	NK-клетки	534
пылевые клещи	640	хемокины	620, 660	<i>Phlojodicarpus sibiricus</i>	510
рак молочной железы.....	792	хронический бактериальный		PPM1D.....	502
рак яичников	798	простатит	421	RAGE	470
ранние тимические мигранты	758	циклофосфамид	432	rs3216780	586
ранозаживление	522	цикорий	476	rs386693509	586
рассеянный склероз	744	ципрофлоксацин	488	SARS-CoV-2	567, 687
реакция отторжения.....	838	циркулирующий β -catenin	798	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	774
ревматоидный артрит.....	758, 766	цитокины	382, 394, 476, 586, 626, 780	STAT3	632
ревматоидный фактор.....	444	цитометрия	838	Tc17-клетки	744
регуляторный ревматоидный		цитотоксические лимфоциты	732	Th1	376
фактор	450	чат-бот	356	Th17	376, 388
регуляция	668	экзосомы.....	811	Th17.1	376
рецепторы	369	экспериментальная модель.....	438	TLR2	720
риносинусит	726	экспериментальный диабет	456	TLR4	720
роговица	838	экспрессия генов.....	562	TLR9	720
роды	586	экспрессия рецепторов	660	TNF	502
сахарный диабет 2-го типа	462, 752	экстракорпоральное		TNF α	522
секрет простаты	421	оплодотворение	586	Toll-подобные рецепторы	562, 720
селезенка	462, 482, 529, 562	экстракт	510	TREC	824
семенник	488	экстракт зверобоя.....	394	<i>Trifolium pratense</i>	462
серопозитивность.....	687	экстракт из голотурий	522	Т-клетки памяти	579
серотонин	786	электромиография	780	Т-лимфоциты	426, 432, 444, 738, 838
сигареты.....	548	эндотип	626	Т-регуляторные клетки.....	758
сигнальный путь.....	798	энтерококки	421	Т-хелперы 17	632
силикаты.....	529	эпидемический паротит.....	732	VZV	720
синдром Шегрена.....	438, 444	эстриол	388	WISP1	798
синтетический аналог активного		яички	470	Wnt-5a	818
центра ГМ-КСФ	668	aTreg.....	388	Wnt-лиганды	818
синусит	856	В-лимфоциты	432	Wnt-сигнальный путь.....	818
система комплемента	696, 704, 712				
системная воспалительная реакция	752				

ИЛЛЮСТРАЦИИ К СТАТЬЕ «ТУЧНЫЕ КЛЕТКИ ЛЕГКИХ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ВОЗДЕЙСТВИИ ГЛИЦЕРИН-ПРОПИЛЕНГЛИКОЛЕВОЙ КУРИТЕЛЬНОЙ СМЕСИ» (АВТОРЫ: АРТАШЯН О.С., ЯРЕМА О.П. [с. 547-552])

ILLUSTRATIONS FOR THE ARTICLE "MAST CELLS OF THE LUNGS DURING EXPERIMENTAL EXPOSURE TO GLYCERIN-PROPYLENE GLYCOL SMOKING MIXTURE" (AUTHORS: ARTASHYAN O.S., YAREMA O.P. [pp. 547-552])

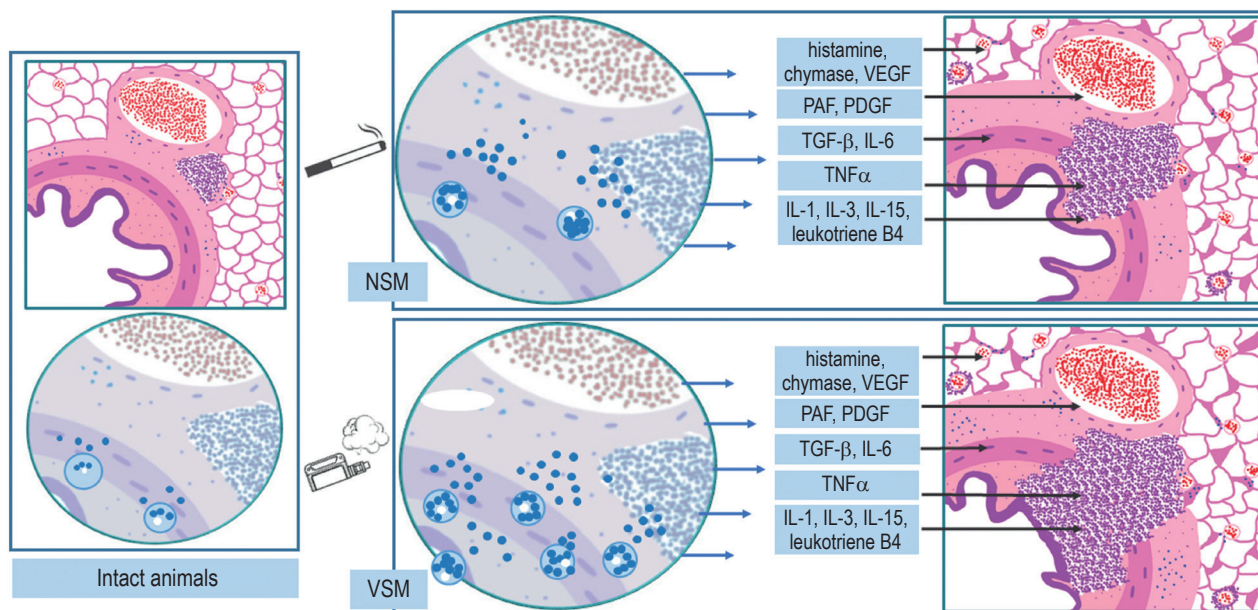


Рисунок 1. Структурные изменения в тканях легких и реакция популяции легочных ТК при воздействии НКС и ВКС

Figure 1. Structural changes in lung tissues and the response of the lung mast cells population under the influence of NSM and VSM (scheme)

ИЛЛЮСТРАЦИИ К СТАТЬЕ «ЭКСПРЕССИЯ РЕЦЕПТОРОВ ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА ПОД ДЕЙСТВИЕМ ВАКЦИННЫХ ШТАММОВ ВИРУСА ВЕТРЯНОЙ ОСПЫ *IN VIVO*» (АВТОРЫ: ЗОТОВА А.В., НАГИЕВА Ф.Г., БАРКОВА Е.П., КРАСКЕВИЧ Д.А., СВИТИЧ О.А. [с. 719-724])

ILLUSTRATIONS FOR THE ARTICLE "EXPRESSION OF INNATE IMMUNITY RECEPTORS UNDER THE *IN VIVO* INFLUENCE OF VACCINE VARICELLA ZOSTER VIRUS STRAINS" (AUTHORS: ZOTOVA A.V., NAGIEVA F.G., BARKOVA E.P., KRASKEVICH D.A., SVITICH O.A. [pp. 719-724])

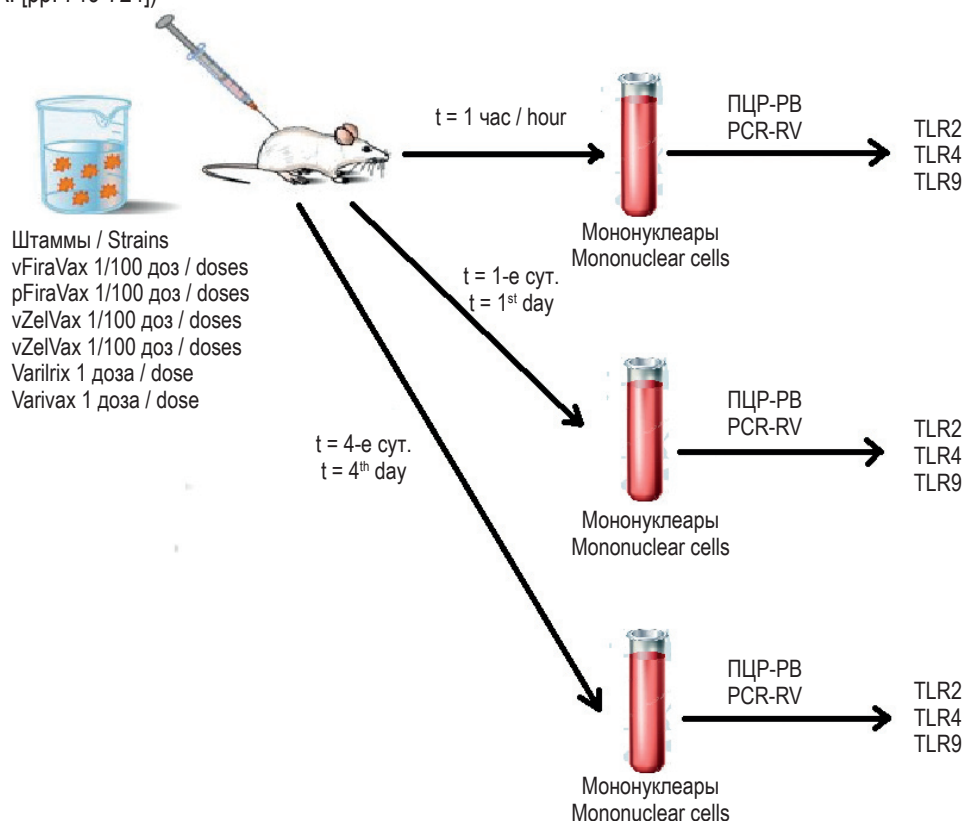


Рисунок 1. Схема эксперимента по иммунизации мышей

Примечание. vFiraVax, pFiraVax, vZelVax, pZelVax – кандидатные штаммы; Varilrix, Varivax – штаммы коммерческих вакцин; ПЦР-РВ – полимеразная цепная реакция в режиме реального времени; TLR2, TLR4, TLR9 – Toll-подобные рецепторы 2, 4, 9.

Figure 1. The scheme of the mouse immunization experiment

Note. vFiraVax, pFiraVax, vZelVax, pZelVax, candidate strains; Varilrix, Varivax, strains of commercial vaccines; Real-time PCR-RV polymerase chain reaction; TLR2, TLR4, TLR9, Toll-like receptors 2, 4, 9.

**ПОДПИСНОЙ ИНДЕКС:
ПРЕССА РОССИИ – 15590**

ISSN 1028-7221



9 771234 567898