

РОССИЙСКОЕ НАУЧНОЕ ОБЩЕСТВО ИММУНОЛОГОВ
(РНОИ)

РОССИЙСКИЙ ИММУНОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

октябрь-декабрь

2023, том 26

№. 4

Основан в 1996 году

Главный редактор

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

Заместитель главного редактора

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

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

Редакционная коллегия

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

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

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

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

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

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

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

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

Купраш Дмитрий Владимирович – член-корреспондент РАН, профессор, доктор биологических наук, Институт молекулярной биологии имени В.А. 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 ИГГ имени М.В. Ломоносова и заведующий отделом молекулярной иммунологии в Институте физико-химической биологии имени Белозерского МГУ, Москва, Россия

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

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

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

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

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

Сеников 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 академии, заведующая научно-практическим отделением клинической иммунологии Ивановского НИИ материнства и детства, Иваново, Россия

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

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

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

Ответственные секретари:

Ризопулу А.П., д.б.н. (Москва)

Ракирянская Н.В. (Санкт-Петербург)

E-mail: rusimmun@gmail.com

Редактор перевода:

Чухловин А.Б., д.м.н. (Санкт-Петербург)

Редактор электронной версии:

Ерофеева В.С. (Санкт-Петербург)

Редакция: тел./факс (812) 233-08-58

Адрес для корреспонденции:

Редакция журнала «Российский иммунологический журнал»

197101, Санкт-Петербург, а/я 130

Электронная версия: www.rusimmun.ru

© Российский иммунологический журнал

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

Данный материал распространяется по лицензии

Creative Commons Attribution 4.0 License.

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

Шварц Герберт – Школа медицины Йонг Лу Лин Национального университета Сингапура

Редакционный совет

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

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

Глушков Андрей Николаевич – доктор медицинских наук, профессор, директор Института экологии человека Федерального исследовательского Центра угля и углехимии СО РАН, Кемерово, Россия

Гущин Игорь Сергеевич – доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН, академик РАН, заведующий отделом № 80 клинической иммунологии и аллергологии ФГБУ «ГНЦ 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, член-корреспондент РАН, директор НИИ вакцины и сыроворотка 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, член-корреспондент РАН, заведующий лабораторией госпитальных инфекций и эпидемиологического анализа, Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия

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

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

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

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

Издательство «Человек»

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

E-mail: mail@mirmed.ru

Тел./факс: (812) 325-25-64.

Подписано в печать 11.09.2023 г. Формат 60 x 90 1/8. Печать офсетная.

Усл. печ. л. 35,75. Тираж 2000 экз. (1-й завод – 1000 экз.)

Отпечатано в типографии ООО «Лесник»

197183, Санкт-Петербург, ул. Сабировская, 37.

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

RUSSIAN SOCIETY OF IMMUNOLOGY
(RSI)

RUSSIAN
JOURNAL OF IMMUNOLOGY

ROSSIYSKIY
IMMUNOLOGICHESKIY
ZHURNAL

October-December

2023, volume 26

No. 4

Published since 1996

Editor-in-chief

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

Deputy Editor-in-Chief

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

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

Editorial board

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Andrey A. Kruglov – PhD, Chief, Laboratory of Chronic Inflammation, German Rheumatism Research Center (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, 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

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

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

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

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

Konstantin V. 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, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Director, I.I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera RAMS, Moscow, Russian Federation

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

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

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

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

Managing Editors:

Anna Rizopulu, PhD (Biology) (Moscow)

Natalia Rakitianskaia, (St. Petersburg)

E-mail: rusimmun@gmail.com

Translation editor:

Alexey B. Chukhlov, 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.

Chelovek Publishing House

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

E-mail: mail@mirmed.ru

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

Passed for printing 11.09.2023. Print format 60 x 90 1/8. Offset printing.

Printed sheets 35.75. Circulation 2000 copies. (1st edition – 1000 copies.)

Print in LLC «Lesnik»

197183, Russian Federation, St. Petersburg, 37 Sabirovskaya str.

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

Гоголева В.С., Друцкая М.С., Недоспасов С.А. ИММУНОБИОЛОГИЯ ЛИМФОТОКСИНА: РОЛЬ В МЫШИНОЙ МОДЕЛИ РАССЕЯННОГО СКЛЕРОЗА.....	437
Юрова К.А., Норкин И.К., Хазиахматова О.Г., Малащенко В.В., Мелашенко О.Б., Иванов П.А., Лигатюк Д.Д., Хлусов И.А., Литвинова Л.С. ВЗАИМОВЛИЯНИЕ ММСК И МОНОНУКЛЕАРНЫХ КЛЕТОК КРОВИ ПРИ СОКУЛЬТИВИРОВАНИИ <i>IN VITRO</i> В ПРИСУТСТВИИ ТРЕХМЕРНОГО ИСКУССТВЕННОГО МАТРИКСА, ИМИТИРУЮЩЕГО РЕГЕНЕРИРУЮЩУЮ КОСТНУЮ ТКАНЬ	443
Тимганова В.П., Шардина К.Ю., Бочкова М.С., Усанина Д.И., Заморина С.А. ПОЛУЧЕНИЕ МИЕЛОИДНЫХ СУПРЕССОРНЫХ КЛЕТОК ИЗ МОНОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ <i>IN VITRO</i>	449
Пашков Е.А., Самойликов Р.В., Пряников Г.А., Быков А.С., Пашков Е.П., Поддубиков А.В., Свитич О.А., Зверев В.В. ИММУНОМОДУЛИРУЮЩИЙ ЭФФЕКТ КОМПЛЕКСОВ мИРНК <i>IN VITRO</i> ПРИ ГРИППОЗНОЙ ИНФЕКЦИИ	457
Хлыстова К.А., Чумаков Н.С., Саркисян Н.Г., Катаева Н.Н., Дроздова Л.И., Тузанкина И.А. ОПИСАНИЕ ТЕРАПЕВТИЧЕСКОГО ЭФФЕКТА НОВОЙ ИММУНОТРОПНОЙ КОМПОЗИЦИИ В МОДЕЛИ ПАРОДОНТИТА У ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ.....	463
Пашинина О.А., Карташова О.Л., Пашкова Т.М., Гриценко В.А. sIgA-ПРОТЕАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ МИКРООРГАНИЗМОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ СЕКРЕТА ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ	471
Сенникова С.В., Топтыгина А.П., Воропаева Е.А. ОТЛИЧИЯ В СПЕКТРЕ МИКРОБИОТЫ КОЖИ И ПАРАМЕТРАХ ЛОКАЛЬНОГО ИММУНИТЕТА В ОЧАГЕ ВОСПАЛЕНИЯ У ДЕРМАТОЛОГИЧЕСКИХ БОЛЬНЫХ ОТ ЗДОРОВЫХ ЛЮДЕЙ	477
Балацкая Н.В., Гаерилова Т.В., Кинкулькина А.Р., Авагян А.С., Свитич О.А. РОЛЬ NLRP3 В ИММУНОПАТОГЕНЕЗЕ НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ГЛАЗ.....	485
Курбатова О.В., Радыгина Т.В., Купцова Д.Г., Петричук С.В., Мовисян Г.Б., Потапов А.С., Мурашкин Н.Н., Абдуллаева Л.М., Фисенко А.П. КООРДИНАЦИЯ СИГНАЛЬНОГО ПУТИ NF- κ B И МЕТАБОЛИЗМА ЛИМФОЦИТОВ У ДЕТЕЙ С АУТОИММУННЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ ...	491
Гончаров А.Г., Татаркина М.А., Лобанова В.В., Козенков И.И., Джигаев А.Х., Гунбин К.В. МИТОХОНДРИАЛЬНАЯ ДИСФУНКЦИЯ КАК ВЕРОЯТНЫЙ МЕХАНИЗМ ЗАПУСКА ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ СУСТАВОВ	501
Валикова О.В., Здор В.В., Сарычев В.А., Тихонов Я.Н., Борода А.В. ЦИТОКИНЫ КАК НЕГОРМОНАЛЬНЫЕ РЕГУЛЯТОРЫ В ПАТОГЕНЕЗЕ ЭНДОКРИНОПАТИЙ	507
Блинова Е.А., Ангельская О.А., Козлов В.А. ЭКСПРЕССИЯ РЕЦЕПТОРА IL-7 НА Th1-, Th17-ЛИМФОЦИТАХ У ПАЦИЕНТОВ С ПСОРИАТИЧЕСКИМ АРТРИТОМ	515
Чумачёва Ю.В., Сташкевич Д.С., Девальд И.В., Сулова Т.А. ОДНОНУКЛЕОТИДНЫЙ ПОЛИМОРФИЗМ ОСТЕОПРОТЕГЕРИНА КАК ВОЗМОЖНЫЙ БИОМАРКЕР РЕВМАТОИДНОГО АРТРИТА В БАШКИРСКОЙ ПОПУЛЯЦИИ ЧЕЛЯБИНСКОЙ ОБЛАСТИ.....	521
Боева О.С., Борисевич В.И., Козлов В.А., Демина Д.В., Сизиков А.Э., Пашкина Е.А. ЭКСПРЕССИЯ «НЕКЛАССИЧЕСКИХ» МОЛЕКУЛ ГЛАВНОГО КОМПЛЕКСА ГИСТОСОВМЕСТИМОСТИ ПРИ РЕВМАТОИДНОМ АРТРИТЕ И БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЕ	527
Гаерилова Е.Д., Гойман Е.В., Демченко Е.Н., Демина Д.В., Вольский Н.Н., Козлов В.А. ОСОБЕННОСТИ ИЗМЕНЕНИЯ УРОВНЯ ВНЕКЛЕТОЧНОЙ ДНК, ПОКАЗАТЕЛЕЙ НЕТОЗА И ВОСПАЛЕНИЯ В ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У ПАЦИЕНТОВ С БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ	533
Мархайчук А.З., Плешкова А.О., Мун А.Ч., Гончаров А.Г. СОПУТСТВУЮЩИЕ ИНФЕКЦИИ У ДЕТЕЙ С АЛЛЕРГОПАТОЛОГИЕЙ В КАЛИНИНГРАДСКОЙ ОБЛАСТИ.....	541
Васильев Н.Ю., Козлова Я.И., Фролова Е.В., Учеваткина А.Е., Филиппова Л.В., Аак О.В., Соболев А.В., Васильева Н.В. МАРКЕРЫ ЭОЗИНОФИЛЬНОГО ВОСПАЛЕНИЯ ДЫХАТЕЛЬНЫХ ПУТЕЙ У ПАЦИЕНТОВ С МИКОГЕННОЙ СЕНСИБИЛИЗАЦИЕЙ	547
Хисамутдинова Д.Р., Козлова Я.И., Башнина Е.Б., Фролова Е.В., Учеваткина А.Е., Филиппова Л.В., Васильева Н.В. ПОКАЗАТЕЛИ КЛЕТОЧНОГО И ГУМОРАЛЬНОГО ИММУНИТЕТА У ПАЦИЕНТКИ С ЦЕНТРАЛЬНОЙ ФОРМОЙ ПРЕЖДЕВРЕМЕННОГО ПОЛОВОГО РАЗВИТИЯ В АНАМНЕЗЕ	553
Мухаметзянова В.Г., Рыбакова О.Г., Пальченко П.М., Петрунина С.Ю. КЛИНИЧЕСКИЙ СЛУЧАЙ ВТОРИЧНОЙ ЭОЗИНОФИЛИИ У РЕБЕНКА	559
Чепурнова Н.С., Кныш С.В., Ющук В.Н., Маркелова Е.В., Санацкий К.Р., Ющенко А.Н., Ермолицкая М.З. СОДЕРЖАНИЕ МАТРИКСНОЙ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗЫ 2-ГО ТИПА (ММР-2) И КОМПЛЕКСОВ ММР-9/ТИМР-1, ММР-2/ТИМР-2 И ОБЩЕГО ХОЛЕСТЕРИНА У ПРАКТИЧЕСКИ ЗДОРОВЫХ ЛЮДЕЙ И ПАЦИЕНТОВ С АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИЕЙ	567
Маркелова Е.В., Фисенко В.Г., Зенина А.А., Силаев А.А., Ермолицкая М.З., Шуматов В.Б. ДИНАМИКА УРОВНЯ ТРАНСФОРМИРУЮЩИХ ФАКТОРОВ РОСТА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ПРИ ОСТРОМ ПОЧЕЧНОМ ПОВРЕЖДЕНИИ У ПАЦИЕНТОВ ПОСЛЕ АОРТОКОРОНАРНОГО ШУНТИРОВАНИЯ	573

Митропанова М.Н., Пономаренко Т.А., Чудилова Г.А., Тетерин Ю.В., Чапурина В.Н. ДИСФУНКЦИИ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ ПРИ ГНОЙНО-ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ ЧЕЛЮСТНО-ЛИЦЕВОЙ ОБЛАСТИ У ДЕТЕЙ	579
Норка А.О., Воробьев С.В., Кузнецова Р.Н., Серебрякова М.К., Кудрявцев И.В., Коваленко С.Н., Монашенко Д.Н. АНАЛИЗ РЕГУЛЯТОРНЫХ Т-ЛИМФОЦИТОВ У ПАЦИЕНТОВ С ЧЕРЕПНО-МОЗГОВОЙ ТРАВМОЙ	587
Филиппова Ю.Ю., Алексеева А.С., Бурмистрова А.Л. ЭКСПРЕССИЯ ЦИТОКИНОВ ЛЕЙКОЦИТАМИ В АССОЦИИ С ТЯЖЕстью АУТИЗМА У ДЕТЕЙ	593
Мордык А.В., Багешева Н.В., Моисеева М.В., Антипова Е.П., Стрельцова В.В. ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ И БИОХИМИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ НЕБЛАГОПРИЯТНОГО ИСХОДА ЗАБОЛЕВАНИЯ ПРИ COVID-19 И АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИИ	599
Абрамова Н.Д., Меремьянина Е.А., Калюжная Н.О., Поддубиков А.В., Костинов М.П., Греченко В.В., Свитиц О.А. ЭКСПРЕССИЯ И ПРОДУКЦИЯ ЦИТОКИНОВ У ПАЦИЕНТОВ С ТЯЖЕлым ТЕЧЕНИЕМ SARS-CoV-2	603
Сайтгаллина М.А., Останкова Ю.В., Арсентьева Н.Е., Коробова З.Р., Любимова Н.Е., Кащенко В.А., Куликов А.Н., Певцов Д.Э., Станевич О.В., Черных Е.И., Тополян Арег А. ЗНАЧИМОСТЬ ОПРЕДЕЛЕНИЯ УРОВНЕЙ МОЛЕКУЛ ТРЕС И КРЕС В ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ДЛЯ ПРОГНОЗА ИСХОДА ЗАБОЛЕВАНИЯ COVID-19 В ОСТРЫЙ ПЕРИОД	611
Сафронова Э.А., Рябова Л.В., Зурочка А.В. ОСОБЕННОСТИ ИММУННОГО СТАТУСА ПАЦИЕНТОВ С ОСТРЫМ КОРОНАРНЫМ СИНДРОМОМ, БОЛЕВШИХ И НЕ БОЛЕВШИХ COVID-19, В ЗАВИСИМОСТИ ОТ УРОВНЯ В1-ЛИМФОЦИТОВ	619
Костинов М.П., Чжан Чэнь, Храпунова И.А., Печеник А.С., Уткин В.А., Лактионова М.Н., Машилов К.В., Соловьева И.Л. ДИНАМИКА ПОКАЗАТЕЛЕЙ ТРОМБОЦИТОВ И D-ДИМЕРА ВАКЦИНИРОВАННЫХ ЛИЦ, ЗАБОЛЕВШИХ COVID-19, ПО СРАВНЕНИЮ С НЕ ИММУНИЗИРОВАННЫМИ ПРОТИВ ЭТОЙ ИНФЕКЦИИ	627
Крюкова Н.О., Хасанова А.А., Баранова И.А., Костинов М.П., Свитиц О.А., Чучалин А.Г. ГУМОРАЛЬНЫЙ ИММУННЫЙ ОТВЕТ СЛИЗИСТЫХ ДЫХАТЕЛЬНЫХ ПУТЕЙ У МЕДИЦИНСКИХ РАБОТНИКОВ В ПОСТКОВИДНОМ ПЕРИОДЕ	633
Добрынина М.А., Зурочка А.В., Зурочка В.А., Рябова Л.В., Сарapulьцев А.П. ФОРМИРОВАНИЕ ПОДХОДОВ К ИММУНОКОРРЕКЦИИ НАРУШЕНИЙ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ У ПОСТКОВИДНЫХ ПАЦИЕНТОВ	641
Атажахова М.Г., Нестерова И.В., Чудилова Г.А., Матушкина В.А., Ковалева С.В., Чапурина В.Н. ПОЗИТИВНЫЕ ЭФФЕКТЫ РЕКОМБИНАНТНОГО ИНТЕРФЕРОНА $\alpha 2b$ НА ФЕНОТИП СУБПОПУЛЯЦИИ CD16⁺IFNα/β1-CD119⁺, CD16⁺IFNα/β1⁺CD119⁺ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ У ПАЦИЕНТОВ С ПОСТКОВИДНЫМ СИНДРОМОМ И ГЕРПЕСВИРУСНЫМИ ИНФЕКЦИЯМИ	647
Костинов М.П., Абрамова Н.Д., Осипцов В.Н., Татевосов В.Р., Гайнитдинова В.В., Крюкова Н.О., Баранова И.А., Хромова Е.А., Коровкина Е.С., Чучалин А.Г., Свитиц О.А., Машилов К.В. СЕКРЕТОРНЫЙ IgA У ПАЦИЕНТОВ С COVID-19 ПРИ РАЗЛИЧНЫХ СПОСОБАХ ПРИМЕНЕНИЯ ПОЛИКОМПОНЕНТНОЙ ВАКЦИНЫ «ИММУНОВАК-ВП-4»	657
Астраханцева И.В. СРАВНЕНИЕ ИММУННОГО ОТВЕТА НА РАЗЛИЧНЫЕ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ SARS-CoV-2 В ТЕЧЕНИЕ 6 МЕСЯЦЕВ ПОСЛЕ НАЧАЛА ВАКЦИНАЦИИ И ПОСЛЕ РЕВАКЦИНАЦИИ	665
Чапурина В.Н., Нестерова И.В., Чудилова Г.А., Ковалева С.В., Лягуша Д.Э., Тетерин Ю.В., Барова Н.К., Тараканов В.А. ЭФФЕКТИВНОСТЬ КОМПЛЕКСНОГО ПОСЛЕОПЕРАЦИОННОГО ЛЕЧЕНИЯ С ВКЛЮЧЕНИЕМ ТЕРАПИИ ИММУНОМОДУЛИРУЮЩИМ ГЕКСАПЕПТИДОМ У ДЕТЕЙ С ОСТРОЙ ДЕСТРУКТИВНОЙ ПНЕВМОНИЕЙ	671
Чудилова Г.А., Чичерев Е.А., Тетерин Ю.В., Чапурина В.Н., Тараканов В.А., Барова Н.К., Нестерова И.В. КЛИНИКО-ИММУНОЛОГИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИММУНОМОДУЛИРУЮЩЕГО ГЕКСАПЕПТИДА АРГИНИЛ-АЛЬФА-АСПАРТИЛ-ЛИЗИЛ-ВАЛИЛ-ТИРОЗИЛ-АРГИНИН В КОМПЛЕКСНОМ ПОСЛЕОПЕРАЦИОННОМ ЛЕЧЕНИИ ДЕТЕЙ С ОСТРЫМ ОСТЕОМИЕЛИТОМ	679
Нестерова И.В., Чудилова Г.А., Тетерин Ю.В., Чичерев Е.А., Чапурина В.Н., Тараканов В.А., Барова Н.К. ЭФФЕКТЫ ВЛИЯНИЯ РЕКОМБИНАНТНОГО IFN$\alpha 2b$ НА СОДЕРЖАНИЕ АНТИГЕНПРЕЗЕНТИРУЮЩЕЙ СУБПОПУЛЯЦИИ CD66b⁺CD16⁺CD33⁺HLA-DR⁺ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ У ДЕТЕЙ С ОСТРЫМ ОСТЕОМИЕЛИТОМ В СИСТЕМЕ <i>IN VITRO</i>	689
Ковалева С.В., Нестерова И.В., Чудилова Г.А., Пиктурно С.Н., Ломтатидзе Л.В. КЛИНИЧЕСКАЯ И ИММУНОЛОГИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИММУНОМОДУЛИРУЮЩЕГО ГЕКСАПЕПТИДА, АССОЦИИРОВАННАЯ С ВОССТАНОВЛЕНИЕМ СУБПОПУЛЯЦИЙ CD11b⁺CD64⁺CD32⁺CD16⁺ И CD11b⁺CD64⁺CD32⁺CD16⁺ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ У ЖЕНЩИН С ХРОНИЧЕСКИМИ ИНФЕКЦИОННО-ВОСПАЛИТЕЛЬНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ ОРГАНОВ МАЛОГО ТАЗА	697
Савин Т.В., Тюрина Т.О., Милчкина А.М., Дрозд И.В., Кузнецова Р.Н., Симбирцев А.С., Тополян Арег А. КЛИНИКО-ИММУНОЛОГИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ ИНТРАНАЗАЛЬНОГО ИНТЕРФЕРОНА В ПОСТВАКЦИНАЛЬНОМ ПЕРИОДЕ У ПАЦИЕНТОВ, ВАКЦИНИРОВАННЫХ ПРОТИВ КОРОНАВИРУСА SARS-CoV-2	705
Авторский указатель	713
Предметный указатель	714

CONTENTS

<i>Gogoleva V.S., Drutskaya M.S., Nedospasov S.A.</i> IMMUNOBIOLOGY OF LYMPHOTOXIN: ROLE IN A MOUSE MODEL OF MULTIPLE SCLEROSIS	437
<i>Yurova K.A., Norkin I.K., Khaziakhmatova O.G., Malashchenko V.V., Melashchenko O.B., Ivanov P.A., Ligatyuk D.D., Khlusov I.A., Litvinova L.S.</i> INTERACTION BETWEEN MSCS AND BLOOD MONONUCLEAR CELLS DURING IN VITRO CO-CULTIVATION IN THE PRESENCE OF A THREE-DIMENSIONAL ARTIFICIAL MATRIX MIMICKING REGENERATING BONE TISSUE	443
<i>Timganova V.P., Shardina K.Yu., Bochkova M.S., Usanina D.I., Zamorina S.A.</i> IN VITRO PRODUCTION OF MYELOID-DERIVED SUPPRESSOR CELLS FROM PERIPHERAL BLOOD MONOCYTES	449
<i>Pashkov E.A., Samoilkov R.V., Pryanikov G.A., Bykov A.S., Pashkov E.P., Poddubikov A.V., Svitich O.A., Zverev V.V.</i> IN VITRO IMMUNOMODULATORY EFFECT OF siRNA COMPLEXES IN THE INFLUENZA INFECTION	457
<i>Khlystova K.A., Chumakov N.S., Sarkisyan N.G., Kataeva N.N., Drozdova L.I., Tuzankina I.A.</i> THERAPEUTIC EFFECT OF A NEW IMMUNOTROPIC COMPOSITION TESTED IN THE MODEL OF PERIODONTITIS IN EXPERIMENTAL ANIMALS	463
<i>Pashinina O.A., Kartashova O.L., Pashkova T.M., Gritsenko V.A.</i> slgA-PROTEASE ACTIVITY OF MICROORGANISMS ISOLATED FROM THE PROSTATE SECRETION	471
<i>Sennikova S.V., Toptygina A.P., Voropaeva E.A.</i> DIFFERENCES IN THE SKIN MICROBIOTA SPECTRUM AND PARAMETERS OF LOCAL IMMUNITY IN THE AREAS OF INFLAMMATION IN SKIN DISEASES AND HEALTHY PEOPLE	477
<i>Balatskaya N.V., Gavrilova T.V., Kinkulkina A.R., Svitich O.A., Avagyan A.S.</i> ROLE OF NLRP3 IN THE IMMUNOPATHOGENESIS OF NEURODEGENERATIVE EYE DISEASES	485
<i>Kurbatova O.V., Radygina T.V., Kuptsova D.G., Petrichuk S.V., Movsisyan G.B., Potapov A.S., Murashkin N.N., Abdullayeva L.M., Fisenko A.P.</i> COORDINATION OF THE NF-κB SIGNALING PATHWAY AND LYMPHOCYTE METABOLISM IN CHILDREN WITH AUTOIMMUNE DISEASES	491
<i>Goncharov A.G., Tatarikina M.A., Lobanova V.V., Kozenkov I.I., Dzhigkaev A.Kh., Gunbin K.V.</i> MITOCHONDRIAL DYSFUNCTION AS A PROBABLE MECHANISM FOR TRIGGERING INFLAMMATORY JOINT DISEASES	501
<i>Valikova O.V., Zdor V.V., Sarychev V.A., Tikhonov Ya.N., Boroda A.V.</i> CYTOKINES AS NON-HORMONAL REGULATORS IN THE PATHOGENESIS OF ENDOCRINOPATHIES	507
<i>Blinova E.A., Angelskaya O.A., Kozlov V.A.</i> EXPRESSION OF IL-7 RECEPTOR ON Th1, Th17 LYMPHOCYTES IN PATIENTS WITH PSORIATIC ARTHRITIS	515
<i>Chumacheva Yu.V., Stashkevich D.S., Devald I.V., Suslova T.A.</i> SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISM OF OSTEOPROTEGERIN AS A POSSIBLE BIOMARKER OF RHEUMATOID ARTHRITIS IN BASHKIR POPULATION OF CHELYABINSK REGION	521
<i>Boeva O.S., Borisevich V.I., Kozlov V.A., Demina D.V., Sizikov A.E., Pashkina E.A.</i> EXPRESSION OF "NON-CLASSICAL" MOLECULES OF THE MAIN HISTOCOMPATIBILITY COMPLEX IN RHEUMATOID ARTHRITIS AND BRONCHIAL ASTHMA	527
<i>Gavrilova E.D., Goiman E.V., Demchenko E.N., Demina D.V., Volskiy N.N., Kozlov V.A.</i> CHARACTERISTIC CHANGES OF EXTRACELLULAR DNA LEVELS, INDICES OF NETOSIS AND INFLAMMATION IN PERIPHERAL BLOOD IN PATIENTS WITH ASTHMA	533
<i>Markhaychuk A.Z., Pleshkova A.O., Mun A.Ch., Goncharov A.G.</i> CONCOMITANT INFECTIONS IN CHILDREN WITH ALLERGIC PATHOLOGY IN THE KALININGRAD REGION	541
<i>Vasiliev N.Yu., Kozlova Ya.I., Frolova E.V., Uchevatkina A.E., Filippova L.V., Aak O.V., Sobolev A.V., Vasilyeva N.V.</i> MARKERS OF EOSINOPHILIC INFLAMMATION OF AIRWAYS IN PATIENTS WITH FUNGAL SENSITIZATION	547
<i>Khisamutdinova D.R., Kozlova Ya.I., Bashnina E.B., Frolova E.V., Uchevatkina A.E., Filippova L.V., Vasilyeva N.V.</i> INDICES OF CELLULAR AND HUMORAL IMMUNITY IN A PATIENT WITH A HISTORY OF CENTRAL PRECOCIOUS PUBERTY IN ANAMNESIS	553
<i>Mukhametzyanova V.G., Rybakova O.G., Palchenko P.M., Petrunina S.Yu.</i> A CLINICAL CASE OF SECONDARY EOSINOPHILIA IN A CHILD	559
<i>Chepurnova N.S., Knys S.V., Yushchuk V.N., Markelova E.V., Sanatsky K.R., Yushchenko A.N., Yermolitskaya M.Z.</i> CONTENTS OF MATRIX METALLOPROTEINASE TYPE 2 (MMP-2) AND COMPLEXES MMP-9/TIMP-1, MMP-2/TIMP-2, AND TOTAL CHOLESTEROL IN PRACTICALLY HEALTHY PEOPLE AND PATIENTS WITH HYPERTENSION	567
<i>Markelova E.V., Fisenko V.G., Zenina A.A., Silaev A.A., Yermolitskaya M.Z., Shumatov V.B.</i> DYNAMICS OF THE LEVEL OF TRANSFORMING GROWTH FACTORS IN BLOOD SERUM IN ACUTE KIDNEY INJURY IN PATIENTS AFTER CORONARY ARTERY BYPASS GRAFTING	573

Mitropanova M.N., Ponomarenko T.A., Chudilova G.A., Teterin Yu.V., Chapurina V.N.
IMMUNE SYSTEM DYSFUNCTION IN PURULENT INFLAMMATORY DISEASES OF THE MAXILLOFACIAL AREA IN PEDIATRIC PATIENTS ...579

Norka A.O., Vorobyev S.V., Kuznetsova R.N., Serebriakova M.K., Kudryavtsev I.V., Kovalenko S.N., Monashenko D.N.
ANALYSIS OF REGULATORY T LYMPHOCYTES IN PATIENTS WITH TRAUMATIC BRAIN INJURY587

Filippova Yu.Yu., Alekseeva A.S., Burmistrova A.L.
LEUKOCYTE CYTOKINE EXPRESSION IS ASSOCIATED WITH SEVERITY OF AUTISM IN CHILDREN593

Mordyk A.V., Bagisheva N.V., Moiseeva M.V., Antipova E.P., Streltsova V.V.
IMMUNOLOGICAL AND BIOCHEMICAL MARKERS OF ADVERSE OUTCOME IN COVID-19 AND ARTERIAL HYPERTENSION599

Abramova N.D., Meremyanina E.A., Kalyuzhnaya N.O., Poddubikov A.V., Kostinov M.P., Grechenko V.V., Svitich O.A.
CYTOKINE EXPRESSION AND PRODUCTION IN SEVERE CASES OF SARS-CoV-2 INFECTION.....603

Saitgalina M.A., Ostankova Yu.V., Arsentieva N.A., Korobova Z.R., Liubimova N.E., Kashchenko V.A., Kulikov A.N., Pevtsov D.E., Stanevich O.V., Chernykh E.I., Totolian Areg A.
LEVELS OF TREC AND KREC MOLECULES SIGNIFICANCE DETERMINING IN PERIPHERAL BLOOD FOR PREDICTING THE OUTCOME OF COVID-19 DISEASE IN THE ACUTE PERIOD.....611

Safronova E.A., Ryabova L.V., Zurochka A.V.
FEATURES OF IMMUNE STATUS IN PATIENTS WITH ACUTE CORONARY SYNDROME WITH AND WITHOUT COVID-19, DEPENDING ON THE LEVEL OF B1 LYMPHOCYTES619

Kostinov M.P., Zhang Chen, Khrapunova I.A., Pechenik A.S., Utkin V.A., Laktionova M.N., Mashilov K.V., Solovyeva I.L.
TIME-DEPENDENT CHANGES OF PLATELET AND D-DIMER PARAMETERS IN VACCINATED VERSUS NON-IMMUNIZED COVID-19 PATIENTS627

Kryukova N.O., Khasanova A.A., Baranova I.A., Kostinov M.P., Svitich O.A., Chuchalin A.G.
MUCOSAL HUMORAL IMMUNE RESPONSE OF RESPIRATORY TRACT IN MEDICAL WORKERS DURING THE POST-COVID-19 PERIOD.....633

Dobrynina M.A., Zurochka A.V., Zurochka V.A., Ryabova L.V., Sarapultsev A.P.
APPROACHES TO CORRECTION OF IMMUNE SYSTEM DISTURBANCES IN POST-COVID PATIENTS641

Atazhakhova M.G., Nesterova I.V., Chudilova G.A., Matushkina V.A., Kovaleva S.V., Chapurina V.N.
POSITIVE EFFECTS OF RECOMBINANT INTERFERON $\alpha 2b$ ON THE PHENOTYPE OF CD16⁺IFN α β R1-CD119⁺, CD16⁺IFN α β R1+CD119⁻ NEUTROPHIL GRANULOCYTE SUBSET IN PATIENTS WITH POST-COVID SYNDROME AND HERPESVIRUS INFECTIONS647

Kostinov M.P., Abramova N.D., Osipov V.N., Tatevosov V.R., Gainitdinova V.V., Kryukova N.O., Baranova I.A., Khromova E.A., Korovkina E.S., Chuchalin A.G., Svitich O.A., Mashilov K.V.
SECRETORY IgA IN PATIENTS WITH COVID-19 AT DIFFERENT REGIMENS OF USING MULTICOMPONENT VACCINE IMMUNOVAC-VP-4657

Astrakhantseva I.V.
COMPARISON OF IMMUNE RESPONSE TO VARIOUS SARS-CoV-2 VACCINES WITHIN 6 MONTHS AFTER STARTING VACCINATION AND FOLLOWING REVACCINATION665

Chapurina V.N., Nesterova I.V., Chudilova G.A., Kovaleva S.V., Lyagusha D.E., Teterin Yu.V., Barova N.K., Tarakanov V.A.
EFFICIENCY OF COMBINED POSTOPERATIVE TREATMENT INCLUDING AN IMMUNOMODULATORY HEXAPEPTIDE IN CHILDREN WITH ACUTE DESTRUCTIVE PNEUMONIA.....671

Chudilova G.A., Chicherev E.A., Teterin Yu.V., Chapurina V.N., Tarakanov V.A., Barova N.K., Nesterova I.V.
CLINICAL AND IMMUNOLOGICAL EFFICACY OF THE IMMUNOMODULATING HEXAPEPTIDE ARGINYL-ALPHA-ASPARTYL-LYSYL-VALYL-TYROSYL-ARGININE IN THE COMPLEX POSTOPERATIVE TREATMENT OF CHILDREN WITH ACUTE OSTEOMYELITIS679

Nesterova I.V., Chudilova G.A., Teterin Yu.V., Chicherev E.A., Chapurina V.N., Tarakanov V.A., Barova N.K.
IN VITRO EFFECTS OF RECOMBINANT IFN $\alpha 2b$ ON THE CONTENT OF ANTIGEN-PRESENTING CD66b⁺CD16⁺CD33⁺HLA-DR⁺ SUBSET OF NEUTROPHILS IN CHILDREN WITH ACUTE OSTEOMYELITIS689

Kovaleva S.V., Nesterova I.V., Chudilova G.A., Pikturno S.N., Lomtadze L.V.
CLINICAL AND IMMUNOLOGICAL EFFICACY OF IMMUNOMODULATING HEXAPEPTIDE ASSOCIATED WITH THE RESTORATION OF CD11b⁺CD64⁺CD32⁺CD16⁺ AND CD11b⁺CD64⁺CD32⁺CD16⁺ NEUTROPHIL GRANULOCYTES SUBSET IN WOMEN WITH CHRONIC INFECTIOUS AND INFLAMMATORY DISEASES OF THE PELVIC ORGANS697

Savin T.V., Tyurina T.O., Milichkina A.M., Drozd I.V., Kuznetsova R.N., Simbirtsev A.S., Totolian Areg A.
CLINICAL AND IMMUNOLOGICAL EFFICACY OF INTRANASAL INTERFERON IN THE POSTVACCINATION PERIOD IN PATIENTS VACCINATED AGAINST SARS-CoV-2 CORONAVIRUS705

Author index713

Subject index714

ИММУНОБИОЛОГИЯ ЛИМФОТОКСИНА: РОЛЬ В МЫШИНОЙ МОДЕЛИ РАССЕЯННОГО СКЛЕРОЗА

Гоголева В.С.¹, Друцкая М.С.^{1,2}, Недоспасов С.А.^{1,2}

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

² Научно-технологический университет «Сириус», Федеральная территория «Сириус», Краснодарский край, Россия

Резюме. Сложность иммунобиологии лимфотоксина (LT α) связана с несколькими модальностями передачи сигнала – от растворимого гомотримера или от мембранного гетеротримера, с участием минимум трех рецепторов. Известно, что лимфотоксин критически важен для образования и поддержания нормальной архитектуры вторичных лимфоидных органов. Несмотря на эти гомеостатические функции LT α , его избыточная продукция характерна для таких аутоиммунных заболеваний, как ревматоидный артрит и рассеянный склероз. Роль лимфотоксина в развитии модели рассеянного склероза у мышей, экспериментальном аутоиммунном энцефаломиелите (ЕАЕ), считалась патогенной, так как в ранних работах мыши с генетической инактивацией LT α были резистентны к индукции ЕАЕ. Однако индукция ЕАЕ у RAG1-дефицитных мышей, которым был осуществлен адаптивный перенос костного мозга от LT α -дефицитных мышей, приводила к развитию клинических симптомов ЕАЕ, тем самым ставя под сомнение вывод о роли LT α в развитии ЕАЕ.

Целью работы было прояснение роли LT α в ЕАЕ, вызываемого иммунизацией MOG₃₅₋₅₅-пептидом. Для этого использовали мышей с генетическим дефицитом по LT α или по LT β R, являющимся рецептором для мембранного комплекса. Нокаутные по LT α мыши были созданы в лаборатории ранее и свободны от артефакта, связанного с дизайном генетической конструкции, который приводил к подавлению экспрессии гена TNF в миелоидных клетках у широко распространенного «классического» нокаута по LT α .

Оказалось, что мыши с дефицитом LT α и с интактной экспрессией TNF развивали ЕАЕ, сравнимый по клиническим показателям с мышами дикого типа. В то же время генетическая инактивация LT β R приводила к задержке в развитии ЕАЕ, однако на поздних этапах заболевания результатом удаления LT β R было ухудшение клинических симптомов ЕАЕ.

Таким образом, вклад LT α в развитие ЕАЕ является более сложным, чем предполагали ранее, а LT β R выполняет различные функции в зависимости от стадии заболевания – патогенную на ранней стадии и защитную на поздних этапах развития болезни.

Ключевые слова: цитокины, лимфотоксин, LT β R, мышинные модели, рассеянный склероз, ЕАЕ

Адрес для переписки:

Недоспасов Сергей Артурович
ФГБУН «Институт молекулярной биологии
имени В.А. Энгельгардта»
119991, Россия, Москва, ул. Вавилова, 32.
Тел.: 8 (499) 135-23-11.
E-mail: sergei.nedospasov@gmail.com

Address for correspondence:

Sergei A. Nedospasov
Engelhardt Institute of Molecular Biology
32 Vavilov St
Moscow
119991 Russian Federation
Phone: +7 (499) 135-23-11.
E-mail: sergei.nedospasov@gmail.com

Образец цитирования:

В.С. Гоголева, М.С. Друцкая, С.А. Недоспасов
«Имунобиология лимфотоксина: роль в мышинной
модели рассеянного склероза» // Российский
иммунологический журнал, 2023. Т. 26, № 4. С. 437-442.
doi: 10.46235/1028-7221-13534-IOL

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

For citation:

V.S. Gogoleva, M.S. Drutskaya, S.A. Nedospasov
“Immunobiology of lymphotoxin: Role in a mouse model of
multiple sclerosis”, Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy
Immunologicheskii Zhurnal, 2023, Vol. 26, no. 4, pp. 437-442.
doi: 10.46235/1028-7221-13534-IOL

© Gogoleva V.S. et al., 2023
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.46235/1028-7221-13534-IOL

IMMUNOBIOLOGY OF LYMPHOTOXIN: ROLE IN A MOUSE MODEL OF MULTIPLE SCLEROSIS

Gogoleva V.S.^a, Drutskaya M.S.^{a, b}, Nedospasov S.A.^{a, b}

^a Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

^b Sirius University of Science and Technology, Krasnodar Region, Russian Federation

Abstract. Complex immunobiology of lymphotoxin (LT α) is due to multiple modalities of signal transduction, involving a soluble homotrimer and membrane-bound heterotrimers that engage at three different receptors. While LT α is crucial for the formation and maintenance of secondary lymphoid organs, its overproduction is observed in autoimmune diseases, e.g., rheumatoid arthritis and multiple sclerosis. Initially, LT α was considered pathogenic in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), a mouse model of multiple sclerosis, as demonstrated by resistance of mice with genetic LT α inactivation to EAE induction. However, conflicting observations arose when EAE was induced in RAG1-deficient mice that underwent adoptive bone marrow transfer from LT α -deficient mice, thereby calling into question previous conclusions about the role of LT α in EAE development. This study aimed to investigate the role of LT α in MOG₃₅₋₅₅-induced EAE using mice deficient in LT α or its membrane receptor, LT β R. LT α knockout mice used here were designed to avoid the artifact involving TNF gene downregulation in myeloid cells, which occurred in the conventional LT α knockout mice. Surprisingly, LT α -deficient mice with normal TNF expression developed EAE clinically comparable to wild-type mice. Conversely, genetic inactivation of LT β R delayed EAE onset. However, during the later stages of the disease, LT β R deletion exacerbated clinical symptoms of EAE.

These findings demonstrate that the involvement of LT α in EAE development is more complex than previously suggested, and that LT β R exhibits diverse functions depending on the disease stage, being pathogenic at the early stage and protective at the later stages of EAE.

Keywords: cytokines, lymphotoxin, LT β R, mouse models, multiple sclerosis, EAE

Введение

Термин «лимфотоксин» появился примерно в 1968 г. благодаря экспериментам в американских лабораториях G. Granger [6] и В. Waxman [10] в США. В обоих случаях речь шла о цитотоксической активности по отношению к культуре фибробластов, которую высвобождали активированные лимфоциты. После очистки цитотоксического белка из супернатантов лимфобластоидной линии [1] и молекулярного клонирования [7] лимфотоксином стали называть TNF-подобный цитокин (сгоряча, но временно переименованный в TNF β).

Следующая глава в увлекательной истории о лимфотоксинах была написана в 1993-1994 гг. когда, во-первых, были созданы первые мыши с генетическим нокаутом LT α (бывший TNF β), фенотип которых оказался сенсационным — у них отсутствовали лимфатические узлы и Пейеровы бляшки [4], во-вторых, был открыт партнер

LT α — LT β , образующий мембранный гетеротримерный комплекс с LT α [2], в-третьих, был охарактеризован новый рецептор, LT β R [3], который и передавал сигнал от мембранного лимфотоксина. При этом LT α действительно может существовать и в TNF-подобной конфигурации гомотримера, и сигнализировать через TNFR1. Отметим, что позднее в «классическом» LT α -нокауте был обнаружен «встроенный артефакт», связанный с нарушением экспрессии соседнего гена TNF по меньшей мере в миелоидных клетках из-за неоптимального дизайна таргетирующей генетической конструкции [8].

Функции лимфотоксина были изучены в различных экспериментальных моделях заболевания, в том числе в экспериментальном аутоиммунном энцефаломиелите (EAE), признанной мышинной модели рассеянного склероза. Ранее в работе [12] сообщалось об устойчивости LT α -, но не LT β -дефицитных мышей к EAE, что указы-

вало на патогенную роль лимфотоксина, предположительно в виде растворимого $LT\alpha$. Этот результат как будто подтверждал вывод ранней работы из той же лаборатории [11], в которой использовались блокирующие моноклональные антитела.

В настоящей работе проведенные эксперименты с ЕАЕ на $LT\beta R$ -дефицитных мышях [5] и на $LT\alpha$ -нокаутах, созданных с помощью Cre-loxP технологии [8], привели к новым результатам и выводам.

Материалы и методы

Мыши

В работе использовали мышей на генетической основе C57BL/6с полной инактивацией генов $LT\alpha$ [8] или $LT\beta R$ [5]. В качестве контроля использовали мышей дикого типа C57BL/6. В экспериментах были использованы самки и самцы возраста 9-12 недель. Мышей разводили и содержали в стандартных условиях Питомника лабораторных животных ФИБХ РАН (Уникальная научная установка «Био-модель» ИБХ РАН; Биоресурсная коллекция «Коллекция лабораторных грызунов SPF статуса для фундаментальных, биомедицинских и фармакологических исследований»), имеющего международную аккредитацию AAALACi. Эксперименты на генетически-модифицированных мышях в модели ЕАЕ были одобрены Биоэтическим комитетом ИМБ РАН (Протокол № 3 от 27.10.2023) и проведены в Автономном экспериментально-биологическом комплексе для временного размещения и исследования генетически модифицированных линий лабораторных мышей категории SPF при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Соглашение № 075-15-2019-1660).

MOG₃₅₋₅₅-индуцированный ЕАЕ

Индукцию ЕАЕ осуществляли подкожной иммунизацией 100 мкг MOG₃₅₋₅₅-пептида (Anaspec, США) в смеси с полным адьювантом Фрейнда (Sigma-Aldrich, США), с добавлением 5 мг/мл *Mycobacterium tuberculosis* (BD Difco, США) и последующим двукратным введением 200 нг Pertussis toxin (Sigma-Aldrich, США). Оценку клинических симптомов проводили ежедневно по стандартной шкале, где 0 – отсутствие симптомов заболевания; 1 – полная потеря тонуса хвоста; 2 – полное нарушение рефлекса переворачивания; 2,5 – нарушение походки и хромота; 3 – частичный паралич задних конечностей;

3,5 – полный паралич задних конечностей; 4 – частичный паралич передних конечностей; 4,5 – полный паралич передних конечностей; 5 – полная потеря двигательной активности.

Статистический анализ

Анализ результатов и статистическую обработку проводили в программе GraphPad Prism с помощью one-way ANOVA.

Результаты и обсуждение

Для изучения роли лимфотоксина в развитии ЕАЕ использовали мышей с удалением $LT\alpha$ или $LT\beta R$. Таких мышей подкожно иммунизировали MOG₃₅₋₅₅-пептидом в полном адьюванте Фрейнда. Мы обнаружили, что мыши с удалением $LT\alpha$, полученные в нашей лаборатории [8], восприимчивы к индукции ЕАЕ (рис. 1А) и развивают заболевание, схожее по динамике с заболеванием мышей дикого типа (рис. 1Б, В). Эти результаты не согласуются с опубликованными данными, в которых мыши с конвенциональным удалением $LT\alpha$ были практически полностью резистентны к индукции ЕАЕ [12]. Разногласие фенотипов может объясняться тем, что у мышей с конвенциональным удалением $LT\alpha$ [4] наблюдались дефекты в продукции TNF миелоидными клетками за счет присутствия в генетической конструкции кассеты, ответственной за устойчивость к неомицину [8], которая располагалась на регуляторном участке в предпромоторной области соседнего гена TNF. В действительности $LT\alpha$ -дефицитные $LT\alpha^{\Delta/\Delta}$ мыши (с интактной экспрессией TNF) развивают MOG-зависимый ЕАЕ.

Интересно, что у мышей, дефицитных по $LT\beta R$, наблюдался фенотип, отличный от $LT\alpha^{\Delta/\Delta}$ мышей (рис. 1А), хотя у обеих линий мышей была нарушена передача сигнала от мембранного комплекса лимфотоксина через $LT\beta R$. Так, $LT\beta R^{-/-}$ мыши развивали клинические симптомы ЕАЕ на 14-15 дни после иммунизации (рис. 1Б), что может свидетельствовать о патогенной роли сигналов от $LT\beta R$ на ранних этапах заболевания. В то же время удаление $LT\beta R$ приводило к усилению тяжести клинических симптомов на поздних стадиях ЕАЕ по сравнению с мышами дикого типа и с мышами с делецией $LT\alpha$ (рис. 1В). Развитие хронического заболевания при удалении $LT\beta R$ коррелировало с динамикой симптомов ЕАЕ у мышей, дефицитных по LIGHT, другому лиганду $LT\beta R$ [9]. Возможно, активация именно сигнального пути LIGHT/ $LT\beta R$ на поздних стадиях забо-

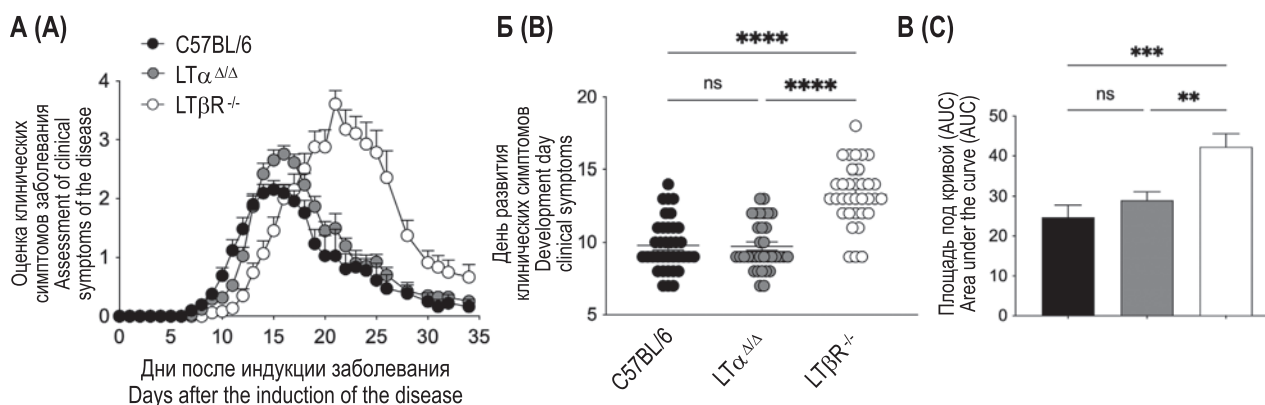


Рисунок 1. Двойственная роль LTβR в развитии ЕАЕ: патогенная функция на ранней стадии ЕАЕ и защитная функция на поздних стадиях заболевания

Примечание. А – развитие клинических симптомов ЕАЕ у мышей дикого типа (C57BL/6) (n = 36), мышей с удалением LTα (n = 34) или LTβR (n = 34), иммунизированных MOG₃₅₋₅₅-пептидом в полном адьюванте Фрейнда. Результаты представлены как среднее значение оценки клинических симптомов ± SEM. Б – день развития клинических симптомов ЕАЕ. Каждая точка представляет собой индивидуальное значение ± SEM. В – площадь под кривой (area under the curve, AUC), рассчитанная для (А). ns – недостоверные отличия, ** – p < 0,01, *** – p < 0,001, **** – p < 0,0001 (one-way ANOVA).

Figure 1. Dual role of LTβR in EAE development: pathogenic at EAE onset and protective at the late stage of the disease
Note. A, EAE disease course in wild-type (C57BL/6) mice (n = 36), mice with LTα (n = 34) or LTβR (n = 34) deletion immunized with MOG₃₅₋₅₅-peptide in complete Freund's adjuvant. Data are shown as mean ± SEM. B, Day of onset of the disease. Each point represents an individual value ± SEM. C, Area under the curve (AUC) calculated for (A). ns, non-significant differences; **, p < 0.01; ***, p < 0.001; ****, p < 0.0001 (one-way ANOVA).

лечения защищает мышей от ухудшения клинических симптомов.

Заключение

В настоящей работе показано, что LTα-дефицитные мыши с интактной экспрессией TNF восприимчивы к индукции MOG₃₅₋₅₅-зависимого ЕАЕ, что опровергает результаты работы [12]. Вывод другой ранней работы [11] объясняется тем, что использованные антитела TN3.12-19 блокируют только TNF (но не LTα₃) мыши.

LTβR может выполнять различные функции в зависимости от стадии ЕАЕ – патогенную на ранних этапах и протективную на поздних эта-

пах ЕАЕ. Протективная функция LTβR может быть результатом взаимодействия с лигандом LIGHT, который необходим на стадии ремиелинизации.

Благодарности

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант №19-75-30032) и Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках Федеральная научно-техническая программа развития генетических технологий на 2019-2027 годы (Соглашение № 075-15-2021-1067).

Авторы благодарят А.А. Круглова и Д.В. Купраша за содействие в работе.

Список литературы / References

1. Aggarwal B.B., Moffat B., Harkins R.N. Human lymphotoxin. Production by a lymphoblastoid cell line, purification, and initial characterization. *J. Biol. Chem.*, 1984, Vol. 259, no. 1, pp. 686-691.
2. Browning J.L., Ngam-ek A., Lawton P., deMarinis J., Tizard R., Chow E.P., Hession C., O'Brine-Greco B., Foley S.F., Ware C.F. Lymphotoxin beta, a novel member of the TNF family that forms a heteromeric complex with lymphotoxin on the cell surface. *Cell*, 1993, Vol. 72, no. 6, pp. 847-856.
3. Crowe P.D., VanArsdale T.L., Walter B.N., Ware C.F., Hession C., Ehrenfels B., Browning J.L., Din W.S., Goodwin R.G., Smith C.A. A lymphotoxin-beta-specific receptor. *Science*, 1994, Vol. 264, no. 5159, pp. 707-710.
4. de Togni P., Goellner J., Ruddle N.H., Streeter P.R., Fick A., Mariathasan S., Smith S.C., Carlson R., Shornick L.P., Strauss-Schoenberger J., Russell J.H., Karr R., Chaplin D.D. Abnormal development of peripheral lymphoid organs in mice deficient in lymphotoxin. *Science*, 1994, Vol. 264, no. 5159, pp. 703-707.

5. Futterer A., Mink K., Luz A., Kosco-Vilbois M.H., Pfeffer K. The lymphotoxin beta receptor controls organogenesis and affinity maturation in peripheral lymphoid tissues. *Immunity*, 1998, Vol. 9, no. 1, pp. 59-70.
6. Granger G.A., Williams T.W. Lymphocyte cytotoxicity in vitro: activation and release of a cytotoxic factor. *Nature*, 1968, Vol. 218, no. 5148, pp. 1253-1254.
7. Gray P.W., Aggarwal B.B., Benton C.V., Bringman T.S., Henzel W.J., Jarrett J.A., Leung D.W., Moffat B., Ng P., Svedersky L.P. Cloning and expression of cDNA for human lymphotoxin, a lymphokine with tumour necrosis activity. *Nature*, 1984, Vol. 312, no. 5996, pp. 721-724.
8. Liepinsh D.J., Grivennikov S.I., Klarmann K.D., Lagarkova M.A., Drutskaya M.S., Lockett S.J., Tessarollo L., McAuliffe M., Keller J.R., Kuprash D.V., Nedospasov S.A. Novel lymphotoxin alpha (LTalpha) knockout mice with unperturbed tumor necrosis factor expression: reassessing LTalpha biological functions. *Mol. Cell. Biol.*, 2006, Vol. 26, no. 11, pp. 4214-4225.
9. Mana P., Linares D., Silva D.G., Fordham S., Scheu S., Pfeffer K., Staykova M., Bertram E.M. LIGHT (TNFSF14/CD258) is a decisive factor for recovery from experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol.*, 2013, Vol. 191, no. 1, pp. 154-163.
10. Ruddle N.H., Waksman B.H. Cytotoxicity mediated by soluble antigen and lymphocytes in delayed hypersensitivity. 3. Analysis of mechanism. *J. Exp. Med.*, 1968, Vol. 128, no. 6, pp. 1267-1279.
11. Ruddle N.H., Bergman C.M., McGrath K.M., Lingenheld E.G., Grunnet M.L., Padula S.J., Clark R.B. An antibody to lymphotoxin and tumor necrosis factor prevents transfer of experimental allergic encephalomyelitis. *J. Exp. Med.*, 1990, Vol. 172, no. 4, pp. 1193-1200.
12. Suen W.E., Bergman C.M., Hjelmstrom P., Ruddle N.H. A critical role for lymphotoxin in experimental allergic encephalomyelitis. *J. Exp. Med.*, 1997, Vol. 186, no. 8, pp. 1233-1240.

Авторы:

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

Authors:

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

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

Недоспасов С.А. — д.б.н., профессор, академик РАН, заведующий лабораторией молекулярных механизмов иммунитета ФГБУН «Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта» Российской академии наук, Москва; руководитель направления «Иммунология и биомедицина» в Научно-технологическом университете «Сириус», Федеральная территория «Сириус», Краснодарский край, Россия

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

Nedospasov S.A., PhD, MD (Biology), Professor, Full Member, Russian Academy of Sciences, Head, Laboratory of Molecular Mechanisms of Immunity, Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow; Head, Division of Immunobiology and Biomedicine, Sirius University of Science and Technology, Krasnodar Region, Russian Federation

Поступила 10.07.2023
Принята к печати 12.07.2023

Received 10.07.2023
Accepted 12.07.2023

ВЗАИМОВЛИЯНИЕ ММСК И МОНОНУКЛЕАРНЫХ КЛЕТОК КРОВИ ПРИ СОКУЛЬТИВИРОВАНИИ *IN VITRO* В ПРИСУТСТВИИ ТРЕХМЕРНОГО ИСКУССТВЕННОГО МАТРИКСА, ИМИТИРУЮЩЕГО РЕГЕНЕРИРУЮЩУЮ КОСТНУЮ ТКАНЬ

Юрова К.А., Норкин И.К., Хазиахматова О.Г., Малащенко В.В.,
Мелащенко О.Б., Иванов П.А., Лигатюк Д.Д., Хлусов И.А.,
Литвинова Л.С.

ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта», г. Калининград, Россия

Резюме. Репарация и регенерация костной ткани – сложный процесс с участием множества клеток, регулируемый многими факторами. Иммунные клетки и цитокины играют решающую роль в регуляции баланса костеобразования и резорбции кости. Однако иммуномодулирующий механизм регенерации кости до сих пор неясен. Тем не менее достоверно известно о взаиморегулирующем влиянии иммунокомпетентных клеток и мезенхимальных стволовых клеток (МСК). МСК и иммунокомпетентные клетки секретируют несколько цитокинов, факторов роста и молекул внеклеточного матрикса, которые играют важную роль в регуляции кроветворения, ангиогенеза, иммунного и воспалительного ответа. Различные исследования подтверждают, что разные молекулы, экспрессируемые МСК, могут инициировать пролиферацию лимфоцитов. Таким образом, исследование взаимного влияния МСК и мононуклеарных клеток крови при совместном сокультивировании *in vitro*, в том числе в присутствии искусственного матрикса, имитирующего регенерирующую костную ткань, является актуальным и своевременным. В настоящем эксперименте были проведены исследования на границе раздела фаз живой / неживой материи, что имитировало систему «регенерирующая кость / кроветворное микроокружение». Был проведен цикл исследований, разделенных во времени, на пластиковой поверхности (2D-модель культивирования) и в присутствии трехмерных искусственных матриксов, имитирующих регенерирующую костную ткань (3D-модель культивирования).

Ключевые слова: ММСК, мононуклеарные клетки крови, 3D-матрикс, *in vitro*, ПЦР, мультиплексный анализ

Адрес для переписки:

Юрова Кристина Алексеевна
ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет
имени Иммануила Канта»
236001, Россия, г. Калининград, ул. Гайдара, 6.
Тел.: 8 (921) 103-88-47.
E-mail: kristina_kofanova@mail.ru

Address for correspondence:

Kristina A. Yurova
Immanuel Kant Baltic Federal University
6 Gaidar St
Kaliningrad
236010 Russian Federation
Phone: +7 (921) 103-88-47.
E-mail: kristina_kofanova@mail.ru

Образец цитирования:

К.А. Юрова, И.К. Норкин, О.Г. Хазиахматова,
В.В. Малащенко, О.Б. Мелащенко, П.А. Иванов,
Д.Д. Лигатюк, И.А. Хлусов, Л.С. Литвинова
«Взаимовлияние ММСК и мононуклеарных клеток
крови при сокультивировании *in vitro* в присутствии
трехмерного искусственного матрикса, имитирующего
регенерирующую костную ткань» // Российский
иммунологический журнал, 2023. Т. 26, № 4. С. 443-448.
doi: 10.46235/1028-7221-13547-IBM

© Юрова К.А. и соавт., 2023

Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

K.A. Yurova, I.K. Norkin, O.G. Khaziakhmatova,
V.V. Malashchenko, O.B. Melashchenko, P.A. Ivanov,
D.D. Ligatyuk, I.A. Khlusov, L.S. Litvinova “Interaction
between MSCs and blood mononuclear cells during *in vitro*
co-cultivation in the presence of a three-dimensional artificial
matrix mimicking regenerating bone tissue”, Russian Journal
of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2023,
Vol. 26, no. 4, pp. 443-448.

doi: 10.46235/1028-7221-13547-IBM

© Yurova K.A. et al., 2023

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

DOI: 10.46235/1028-7221-13547-IBM

INTERACTION BETWEEN MSCS AND BLOOD MONONUCLEAR CELLS DURING *IN VITRO* CO-CULTIVATION IN THE PRESENCE OF A THREE-DIMENSIONAL ARTIFICIAL MATRIX MIMICKING REGENERATING BONE TISSUE

Yurova K.A., Norkin I.K., Khaziakhmatova O.G., Malashchenko V.V., Melashchenko O.B., Ivanov P.A., Ligatyuk D.D., Khlusov I.A., Litvinova L.S.

Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation

Abstract. Bone tissue repair and regeneration is a complex process involving many cells and controlled by multiple factors. Immune cells and cytokines play a crucial role in regulating the balance of bone formation and resorption. However, the immunomodulatory mechanism of bone regeneration is still unclear. Nevertheless, the reciprocal regulatory influence of immunocompetent cells and mesenchymal stem cells (MSCs) is well known. MSCs and immunocompetent cells secrete various cytokines, growth factors, and extracellular matrix molecules that play important roles in regulating hematopoiesis, angiogenesis, immune and inflammatory responses. Several studies confirm that different molecules expressed by MSCs may induce lymphocyte proliferation. Therefore, the study of the mutual influence of MSCs and blood mononuclear cells during *in vitro* co-cultivation, even in the presence of an artificial matrix mimicking regenerating bone tissue, is relevant and expedient. In this experimental series, the studies were performed at the interface between living and non-living substrate phases thus mimicking the “regenerating bone / hematopoietic microenvironment” system. A series of separated in time experiments was performed on a plastic surface (2D culture model) and in the presence of three-dimensional artificial matrices mimicking regenerating bone tissue (3D culture model).

Keywords: mesenchymal stem cells, blood mononuclear cells, 3D matrix, *in vitro*, PCR, multiplex analysis

Исследование выполнено в рамках реализации проекта Государственного задания № FZWM-2020-0010.

Введение

Иммунная система играет важную роль в формировании тканей и резорбции костей. В последнее время многие исследования продемонстрировали сложные взаимодействия между иммунной и скелетной системами. Иммунные клетки и секретируемые ими цитокины способствуют регуляции костного гомеостаза, а костные клетки, включая остеобласты, остеокласты, остециты, также влияют на клеточные функции иммунных клеток.

Лейкоциты крови являются одними из первых клеток, мигрирующих в участок физиологической и, в большей степени, репаративной регенерации костной ткани [4]. Для исследования закономерностей функционирования МНК в подобных условиях была разработана *in vitro* 3D-гомеостатическая модель сокультивирования иммунных клеток с МСК в присутствии искусственного матрикса, имитирующего в трехмер-

ном масштабе минеральное вещество костной ткани.

Известно, что клетки существуют в тканях разной степени жесткости, от мягкой мозговой ткани до жесткой кортикальной кости. *In vitro* было показано, что жесткость матрикса или субстрата также играет важную роль в регуляции дифференцировки МСК [5]. Использование трехмерной (3D) пространственной организации клеточной культуры в условиях культивирования *in vitro* приближено к физиологическим параметрам клеточной жизнедеятельности [1].

В связи с вышесказанным, исследование физиологических механизмов, определяющих реакции МСК и иммунокомпетентных клеток на структурные и гуморальные сигналы микроокружения, является своевременным и актуальным.

В настоящее время появляется все больше данных, указывающих на то, что регуляция иммунного микроокружения является многообещающей терапевтической целью, способствующей функциональной регенерации костной ткани [6].

Таким образом, целью исследования явилось выявление функциональных особенностей МСК

и мононуклеарных клеток крови (МНК) при совместном сокультивировании *in vitro* в присутствии трехмерного искусственного матрикса, имитирующего регенерирующую костную ткань.

Материалы и методы

Для реализации настоящего эксперимента были проведены исследования на границе раздела фаз живой/неживой материи, что имитировало систему «регенерирующая кость / кроветворное микроокружение». Был проведен цикл исследований, разделенных во времени, на пластиковой поверхности (2D-модель культивирования) и в присутствии трехмерных искусственных матриц, имитирующих регенерирующую костную ткань (3D-модель культивирования).

В качестве нормальных иммунокомпетентных клеток, используемых для имитации модели физиологической регенерации *in vitro*, использовали мононуклеарные лейкоциты (МНК). Выделение МНК из лейкоцези здоровых доноров проводилось стандартным методом центрифугирования на градиенте плотности фиколл-урографин (Pharmacia, Швеция) ($\rho = 1,077 \text{ г/см}^3$). Разрешение на проведение исследования получено в локальном этическом комитете Инновационного парка БФУ имени И. Канта (№ 5 от 16 мая 2016 г.).

МСК выделялись из липоаспирата человека (Разрешение № 1 от 28.02.2019 г. локального этического комитета БФУ имени И. Канта), как описано [7].

Титановые подложки из коммерчески чистого титана ВТ1.0, размером $10 \times 10 \times 1 \text{ мм}^3$ и индексом шероховатости (Ra) 2-3 мкм, используемые для имитации *in vitro* состояние трехмерной (3D) культуры, имели двухстороннее покрытие из фосфатов кальция, нанесенное методом микродугового оксидирования на установке Microarc-3.0 (Институт физики прочности и материаловедения СО РАН, г. Томск) в анодном режиме [3].

Для оценки иммунного ответа был произведен комплексный анализ функциональной активности мононуклеарных лейкоцитов в разных условиях культивирования *in vitro* по истечении 48 часов культивирования. На 14-е сутки культивирования оценивали особенности клеточного функционирования мезенхимальных стволовых клеток на пластике и в присутствии трехмерного матрикса. Для изучения особенностей клеточного взаимодействия МСК с клетками иммунной системы было проведено сокультивирование этих клеточных линий в разных условиях экспериментального исследования в соответствии с дизайном эксперимента.

Культивирование МНК, МСК и смешанных культур проводили в полной питательной сре-

де (ППС). ППС состояла из α -МЕМ (Sigma-Aldrich, США), 10% инактивированной (56°C в течение 30 мин) сыворотки крови эмбрионов коров (Sigma-Aldrich, США), 2 мМ/л L-глутамин (Sigma-Aldrich, США), 100 Е/мкг/мл пенициллин/стрептомицин (Gibco Life Technologies, США). Культивирование проводилось в течение 48 часов/14 суток при 37°C , во влажной атмосфере, содержащей 5% CO_2 .

В качестве контрольных моделей использовали монокультуру МНК на пластике, 3D-монокультуру МНК, МСК на пластике, 3D-монокультуру МСК.

Оценка морфофункционального состояния (активации, дифференцировки, созревания, пролиферации) клеточных культур в условиях 2D- и 3D-сокультивирования проводилась с помощью следующих методов:

1. Изучение антигенных детерминант с использованием метода проточной цитофлуориметрии с использованием коктейля моноклональных антител к CD3, CD4, CD8, CD25, CD71, CD95, CD45, CD45RA, CD45RO (eBioscience, США), приготовленного *ex tempore*. А также MSC Phenotyping Kit human – 130-095-198 (Miltenyi Biotec, США) на проточном цитофлуориметре MACS Quant (Miltenyi Biotec, Германия).

2. Количественное определение факторов роста, про- и противовоспалительных цитокинов (IL-1 β , IL-1ra, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-17, Eotaxin, FGF, G-CSF, GM-CSF, IFN γ , IP-10, MCP-1, MIP-1 α , PDGF-BB, MIP-1 β , RANTES, TNF α , VEGF) в супернатантах исследуемых культур клеток проводилось методом проточной флуориметрии на автоматизированном анализаторе (Bio-Plex Protein Assay System, Bio-Rad, США) с использованием коммерческих тест-систем (Bio-PlexProHuman cytokine Group I Assays, Bio-Rad, США).

3. Определение экспрессии мРНК исследуемых генов, ассоциированных дифференцировкой (*U2af114*, *Gfi1*, *hnRNPLL*) иммунокомпетентных клеток проводили с методом полимеразной цепной реакции на амплификаторе CFX96 (Bio-Rad, США).

Статистическая обработка результатов осуществлялась с помощью программы IBM SPSS Statistics 20 (Statistical Package for the Social Sciences).

Результаты и обсуждение

В смешанной модели 2D-культивирования, по истечении 14 суток, соотношения популяций CD4/CD8 соответствовало таковому в монокультуре МНК. Анализ количества клеток, несущих на своей поверхности маркеры ранней (CD25 $^+$,

CD71⁺) и длительной (CD95⁺) активации, показал увеличение клеток в смешанных 2D- и 3D-культурах по сравнению с данными, полученными при оценке краткосрочного (48 часов) культивирования монокультур МНК. Важно отметить, что присутствие трехмерных матриксов в смешанной культуре МСК + МНК статистически значимо увеличивало число клеток с фенотипом CD3⁺CD95⁺.

Также было выявлено увеличение Т-клеток с фенотипом CD3⁺CD45R0⁺ и переходных форм CD3⁺CD45R0⁺CD45RA⁺, которое отмечалось за счет реэкспрессии высокомолекулярной изоформы CD45 – CD45RA⁺.

По истечении 14 суток культивирования в 3D-монокультуре МСК, а также в смешанной модели культивирования (МСК + МНК), как в присутствии трехмерных образцов, имитирующих регенерирующую костную ткань, так и без них, было выявлено достоверное увеличение числа клеток, экспрессирующих маркеры гемопоэтических клеток CD (45⁺, 34⁺, 14⁺, 20⁺). Кроме того, в трехмерной модели монокультуры МСК, а также в обеих смешанных моделях культивирования отмечалось статистически значимое снижение числа клеток, несущих на своей поверхности молекулы CD105⁺ и CD90⁺ (на 14-е сутки) по сравнению со значениями, полученными в 2D-модели. Количество CD73⁺ клеток по окончании времени культивирования фиксировалось на уровне контрольных значений.

Оценка содержания факторов в культуре МСК человека показала, что действие искусственного трехмерного матрикса, имитирующего регенерирующую костную ткань, направлено, преимущественно, на снижение концентрации факторов с провоспалительной (IFN α , IFN γ , IL-6, IP-10, TNF α), хемоаттрактантной (RANTES) и проапоптотической (TRAIL) активностью.

В смешанной модели культивирования МСК + МНК концентрация исследуемых провоспалительных цитокинов статистически значимо увеличивалась, как в условиях культивирования на пластике, так и при добавлении трехмерных матриксов. Отличия были зафиксированы при сравнении с монокультурой мононуклеарных клеток, а также с монокультурой МСК. Важно отметить, что в смешанной 3D-культуре наблюдалась максимальная продукция IFN γ и RANTES. Максимальные значения IL-6 были задетектированы в смешанной двумерной модели культивирования.

В монокультуре МСК добавление трехмерного матрикса в среду культивирования статистически значимо снижало уровень концентрации противовоспалительных цитокинов IL-4, IL-10, IL-13. Однако в смешанной модели культивирования МСК + МНК уровни исследуемых моле-

кул статистически значимо повышались, как в условиях культивирования на пластике, так и в присутствии трехмерных матриксов.

Оценка уровня относительной экспрессии генов дифференцировки Т-лимфоцитов при сокультивировании с трехмерным матриксом в смешанной культуре показала достоверное увеличение экспрессии мРНК гена *U2af114* (в среднем на 87%). Увеличение транскрипции мРНК гена *U2af114* положительно коррелировало с числом Т-клеток с фенотипом CD3⁺CD45R0⁺ в смешанной 3D-культуре. Экспрессия мРНК генов *Gfi1*, *hnRNPLL* детектировалась на уровне значений трехмерной монокультуры МНК.

По результатам исследования смешанной двумерной (2D) культуры МСК и МНК на пластике было выявлено достоверное увеличение уровня концентрации многих исследуемых цитокинов, по сравнению с контрольными культурами. Спектр цитокинов, продуцируемых МСК, способствовал увеличению числа МНК, несущих на своей поверхности маркеры ранней (CD25) и поздней (CD71) активации, а также содержания дубль позитивных лейкоцитов, преимущественно за счет повышения числа CD45R0⁺ клеток. Рост содержания Т-клеток с фенотипом CD3⁺CD45R0⁺ в смешанной культуре был обусловлен увеличением транскрипции мРНК гена *U2AF26*, что подтверждено позитивной корреляционной взаимосвязью между исследуемыми параметрами ($r = 0,67$; $p < 0,05$). При этом транскрипция мРНК гена *Gfi1* оставалась на уровне значений, полученных при оценке монокультур МНК.

Нами было показано, что мононуклеарные клетки крови, в основном CD4⁺Т-клетки, обладали костимулирующим эффектом на продукцию ангиогенных и остеомодулирующих молекул [2].

Паракринное влияние МНК на МСК способствовало увеличению числа гемопоэтических стволовых клеток в смешанной культуре. Таким образом, при *in vitro* моделировании инфильтрации МНК из крови в ткани отмечен всплеск секреторной активности смешанной культуры стромальных клеток и лейкоцитов крови, что лежит в основе воспалительных и регенераторных процессов.

Также было выявлено, что 3D-матрикс с шероховатым КФ покрытием, в условиях моделирования воспалительного инфильтрата МНК, индуцирующего продуктивное воспаление и/или фазу пролиферации воспалительного процесса, способствуют регенерации костной ткани, посредством усиления функциональной (секреторной) активности смешанной культуры стромальных клеток и нормальных лейкоцитов крови.

Заключение

Резюмируя вышесказанное: 3D-матрицы выступают в роли активационных агентов, опосредованно запускающих изменение цитокинового

профиля микроокружения МСК и иммунокомпетентных клеток, что способствует инициации процессов активации, пролиферации и клеточной дифференцировки, необходимых для эффективной регенерации костной ткани.

Список литературы / References

1. Коршунов Д.А., Кондакова И.В. Современные достижения и проблемы в исследовании культур клеток // Успехи современной биологии, 2016. Т. 136, № 4. С. 347-361. [Korshunov D.A., Kondakova I.V. Modern achievements and problems in the study of cell cultures]. *Uspekhi sovremennoy biologii = Advances in Modern Biology*, 2016, Vol. 136, no. 4, pp. 347-361. (In Russ.)
2. Khlusov I.A., Litvinova L.S., Shupletsova V.V., Khaziakhmatova O.G., Malashchenko V.V., Yurova K.A., Shunkin E.O., Krivosheev V.V., Porokhova E.D., Sizikova A.E., Safiullina L.A., Legostaeva E.V., Komarova E.G., Sharkeev Y.P. Costimulatory effect of blood cells and rough calcium phosphate coating on the angiogenic and osteogenic features of adipose-derived multipotent mesenchymal stromal cells in mixed culture as a model of postimplantation tissue repair. *Materials (Basel)*, 2020, Vol. 13, no. 19, 4398. doi: 10.3390/ma13194398.
3. Legostaeva E.V., Kulyashova K.S., Komarova E.G. Physical, chemical and biological properties of microarc deposited calcium phosphate coatings on titanium and zirconium-niobium alloy. *Materialwissenschaft und Werkstofftechnik*, 2013, Vol. 44, no. 2-3, pp. 188-197.
4. Schell H., Duda G.N., Peters A. The haematoma and its role in bone healing. *J. Exp. Orthop.*, 2017, Vol. 4, 5. doi: 10.1186/s40634-017-0079-3.
5. Steward A.J., Kelly D.J. Mechanical regulation of mesenchymal stem cell differentiation. *J. Anat.*, 2015, Vol. 227, no. 6, pp. 717-731.
6. Yang N., Liu Y. The role of the immune microenvironment in bone regeneration. *Int. J. Med. Sci.*, 2021, Vol. 18, no. 16, pp. 3697-3707.
7. Zuk P.A., Zhu M., Mizuno H., Huang J., Futrell J.W., Katz A.J., Benhaim P., Lorenz H.P., Hedrick M.H. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based. *Tissue Eng.*, 2001, Vol. 7, no. 2, pp. 211-228.

Авторы:

Юрова К.А. — к.м.н., старший научный сотрудник Центра иммунологии и клеточных биотехнологий ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта», г. Калининград, Россия

Норкин И.К. — к.б.н., техник Центра иммунологии и клеточных биотехнологий ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта», г. Калининград, Россия

Хазиахматова О.Г. — к.б.н., старший научный сотрудник Центра иммунологии и клеточных биотехнологий ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта», г. Калининград, Россия

Малащенко В.В. — к.б.н., инженер Центра иммунологии и клеточных биотехнологий ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта», г. Калининград, Россия

Authors:

Yurova K.A., PhD (Medicine), Senior Research Associate, Center for Immunology and Cellular Biotechnologies, Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation

Norkin I.K., PhD (Biology), Technician, Center for Immunology and Cellular Biotechnologies, Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation

Khaziakhmatova O.G., PhD (Biology), Senior Research Associate, Center for Immunology and Cellular Biotechnologies, Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation

Malashchenko V.V., Senior Research Associate, Engineer, Center for Immunology and Cellular Biotechnologies, Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation

Мелащенко О.Б. — научный сотрудник Центра иммунологии и клеточных биотехнологий ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта», г. Калининград, Россия

Иванов П.А. — к.м.н., младший научный сотрудник Центра иммунологии и клеточных биотехнологий ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта», г. Калининград, Россия

Лигатюк Д.Д. — инженер Центра иммунологии и клеточных биотехнологий ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта», г. Калининград, Россия

Хлусов И.А. — д.м.н., главный научный сотрудник Центра иммунологии и клеточных биотехнологий ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта», г. Калининград, Россия

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

Melashchenko O.B., Research Associate, Center for Immunology and Cellular Biotechnologies, Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation

Ivanov P.A., PhD (Medicine), Junior Research Associate, Center for Immunology and Cellular Biotechnologies, Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation

Ligatyuk D.D., Engineer, Center for Immunology and Cellular Biotechnologies, Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation

Khlyusov I.A., PhD, MD (Medicine), Chief Research Associate, Center for Immunology and Cellular Biotechnologies, Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation

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

Поступила 08.07.2023
Принята к печати 12.07.2023

Received 08.07.2023
Accepted 12.07.2023

ПОЛУЧЕНИЕ МИЕЛОИДНЫХ СУПРЕССОРНЫХ КЛЕТОК ИЗ МОНОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ *IN VITRO*

Тимганова В.П., Шардина К.Ю., Бочкова М.С., Усанина Д.И.,
Заморина С.А.

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

Резюме. Миелоидные супрессорные клетки (MDSC), как ключевые регуляторы иммунных реакций, представляют интерес с точки зрения разработки и усовершенствования клеточных технологий в биомедицине. Усиление супрессивной активности этих клеток актуально для разработки терапии аутоиммунных заболеваний и невынашивания беременности, а ее подавление может быть полезно при лечении рака, поскольку известно, что MDSC подавляют противоопухолевый иммунитет.

Однако существует проблема, препятствующая активному изучению MDSC, заключающаяся в сложном получении достаточного их количества. Выделение MDSC у онкологических больных сопряжено со сложностями этического характера. Кроме того, такие MDSC могут отличаться по субпопуляционному составу и супрессивной активности в силу индивидуальных факторов. С подобными проблемами могут сталкиваться и исследователи, генерирующие MDSC человека из клеток костного мозга. Поэтому поиск надежного и доступного источника этих клеток для облегчения исследования их функций крайне актуален.

Попытки получить MDSC человека *in vitro* предпринимаются уже давно. В качестве факторов, индуцирующих дифференцировку MDSC вне организма человека, описаны GM-CSF, IL-6, IL-1 β , IL-4, PGE2, LPS, M-CSF, IFN γ . Однако, несмотря на множество использованных факторов, не все схемы однозначно воспроизводимы и приводят к генерации достаточного количества клеток целевой популяции. Ранее нами была разработана и схема дифференцировки MDSC из CD11b⁺ клеток периферической крови человека, которая позволила получить осязательный, но все же недостаточный для исследований функциональной активности процент клеток.

Для того, чтобы повысить количество MDSC в культурах, мы разработали схему дифференцировки этих клеток из моноцитов периферической крови (CD14⁺ клеток), предварительно трансформированных в РСМО (программируемые клетки моноцитарного происхождения). Моноциты, выделенные методом иммуномагнитной сепарации культивировали неделю в дедифференцирующей среде

Адрес для переписки:

Тимганова Валерия Павловна
Институт экологии и генетики микроорганизмов
Уральского отделения Российской академии наук
614081, Россия, г. Пермь, ул. Голева, 13.
Тел.: 8 (342) 280-77-94.
E-mail: timganovavp@gmail.com

Address for correspondence:

Valeria P. Timganova
Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms
13 Golev St
Perm
614081 Russian Federation
Phone: +7 (342) 280-77-94.
E-mail: timganovavp@gmail.com

Образец цитирования:

В.П. Тимганова, К.Ю. Шардина, М.С. Бочкова,
Д.И. Усанина, С.А. Заморина «Получение миелоидных
супрессорных клеток из моноцитов периферической
крови *in vitro*» // Российский иммунологический
журнал, 2023. Т. 26, № 4. С. 449-456.
doi: 10.46235/1028-7221-13987-IVP

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

For citation:

V.P. Timganova, K.Yu. Shardina, M.S. Bochkova,
D.I. Usanina, S.A. Zamorina "In vitro production of myeloid
suppressor cells from peripheral blood monocytes", Russian
Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskiy
Zhurnal, 2023, Vol. 26, no. 4, pp. 449-456.
doi: 10.46235/1028-7221-13987-IVP

© Timganova V.P. et al., 2023
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.46235/1028-7221-13987-IVP

(полная питательная среда с добавлением M-CSF, IL-3 и β -меркаптоэтанола), затем среду заменяли, добавляя GM-CSF, культивировали три дня, и затем добавляли LPS и IL-1 β для индукции супрессивной активности.

Обнаружено, что культивирование CD14⁺ клеток по двухнедельной схеме с предварительным созданием дедифференцирующих условий приводило к незначительному снижению процента живых клеток в культуре. Однако наблюдалась тенденция к увеличению процента MDSC в культуре (с 34 до 40% в среднем) и к усилению их супрессивной активности (экспрессии аргиназы и ИДО). Процент Arg⁺ клеток увеличивался, в среднем, на 10%, а ИДО⁺ клеток – на 16%. Помимо этого, процент зрелых M-MDSC был достоверно в несколько раз выше, чем при использовании схемы дифференцировки из CD11b⁺ клеток.

Таким образом, данный метод получения MDSC позволяет увеличить количество клеток, относящихся к условно «зрелой» моноцитарной субпопуляции MDSC, а также процент функциональных супрессивных клеток в ней. Описанная схема может применяться для повышения качества исследований, направленных на модулирование функций MDSC с целью разработки новых терапевтических подходов.

Ключевые слова: миелоидные супрессорные клетки, дифференцировка MDSC *in vitro*, иммуносупрессия, дедифференцировка моноцитов, CD14⁺ клетки

IN VITRO PRODUCTION OF MYELOID-DERIVED SUPPRESSOR CELLS FROM PERIPHERAL BLOOD MONOCYTES

Timganova V.P., Shardina K.Yu., Bochkova M.S., Usanina D.I.,
Zamorina S.A.

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

Abstract. Myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) are of interest as key regulators of the immune response for the development and improvement of cellular technologies in biomedicine. Enhancing the suppressive activity of these cells is important for developing therapies for autoimmune diseases and miscarriages, and their suppression may be useful in the treatment of cancer, since MDSCs are known to suppress antitumor immunity. However, there is a problem that prevents the active study of MDSCs, i.e., the difficulty in obtaining sufficient numbers of this cell population. Isolation of MDSCs in cancer patients poses an ethical challenge. Moreover, these MDSC may differ in subpopulation composition and suppressive activity due to individual factors. Researchers who generate human MDSC from bone marrow cells may also face similar problems. Therefore, finding a reliable and affordable source of these cells to facilitate the study of their functions is extremely important. Attempts to obtain human MDSCs *in vitro* have been ongoing for a long time. GM-CSF, IL-6, IL-1 β , IL-4, PGE₂, LPS, M-CSF, IFN γ are described as factors that induce the *ex vivo* MDSC differentiation. However, despite multiple factors used, not all protocols are clearly reproducible, leading to generation of a sufficient number of cells in the target population. Previously, we had also developed a scheme for MDSC differentiation from CD11b⁺ cells derived from human peripheral blood, which made it possible to obtain a tangible but still insufficient percentage of cells to study functional activity.

To increase the number of MDSCs in cultures, we developed a protocol aimed for differentiation of these cells from peripheral blood monocytes (CD14⁺ cells) previously transformed into PCMO (programmed cells of monocytic origin). The monocytes isolated by immunomagnetic separation were cultured in a de-differentiating medium (complete culture medium supplemented with M-CSF, IL-3 and β -mercaptoethanol) for one week. Later on, the medium was replaced by the addition of GM-CSF, being cultured for three days, followed by addition of LPS and IL-1 β in order to induce suppressive activity. We have found that culturing CD14⁺ cells on a two-week schedule with prior creation of dedifferentiation conditions resulted in a slightly decreased percentage of viable cells in culture. However, there was a trend towards an increased ratio of MDSCs in culture (from an average of 34 to 40%) and an increase in their suppressive activity (arginase and IDO expression). The percentage of Arg⁺ cells increased by average of 10%, and IDO⁺ cells, by 16%. Moreover, the percentage of

mature M-MDSCs was significantly (several-fold) higher when compared with differentiation protocol using CD11b⁺ cells. Hence, this method of MDSCs production enables us to increase the number of cells belonging to the conditionally “mature” monocyte subpopulation of MDSCs, as well as the percentage of functional suppressor cells in the population. The described scheme may be used to improve the quality of studies aimed at modulating MDSC functions in order to develop new therapeutic approaches.

Keywords: myeloid-derived suppressor cells, MDSC differentiation in vitro, immunosuppression, monocyte dedifferentiation, CD14⁺ cells

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 22-25-00378).

Введение

Миелоидные супрессорные клетки (MDSC) – немногочисленная популяция клеток миелоидного происхождения, включающая в себя подобные нейтрофилам (PMN-MDSC) и моноцитам (M-MDSC) клетки, способные подавлять иммунный ответ, в том числе и противоопухолевый. Количество MDSC в периферической крови увеличивается при таких патологиях, как рак, хроническое воспаление, сепсис, аутоиммунные заболевания, и в норме – во время беременности [1]. Кроме того, происходит накопление миелоидных супрессоров непосредственно в микроокружении опухоли, в местах аутоиммунного воспаления, в плаценте [3].

Механизм иммуносупрессивного действия MDSC опосредован поверхностными молекулами CD73, ADAM17, PD-L1, Gal-9 и CD40, цитокинами IL-10, TGF-β и активными формами кислорода. Помимо этого, MDSC способны истощать в среде аминокислоты аргинин и триптофан, используя для этого ферменты индуцибельную NO-синтазу и аргиназу 1 (Arg 1).

Являясь одними из самых мощных иммуносупрессивных клеток, MDSC способствуют прогрессированию опухоли, ингибируя противоопухолевые функции T- и NK-клеток. Помимо этого, MDSC напрямую стимулируют развитие опухоли, способствуя неоваскуляризации и инвазии опухолевых клеток, создают предметастатическую среду [3] и играют большую роль в возникновении резистентности опухоли к противораковой терапии [5].

Безусловно, нельзя говорить об однозначно негативном значении миелоидных супрессоров для организма. Их важная биологическая роль заключается в обеспечении иммунной толерантности матери к плоду [6]. Кроме того, MDSC принимают участие в поддержании гомеостаза, ангиогенезе и заживлении ран [10].

Однако знания о месте MDSC в аутоиммунитете находятся в стадии накопления. В ряде исследований описаны полезные функции этих клеток при аутоиммунных заболеваниях, подтверждаю-

щие возможность использования MDSC в терапии соответствующих патологий [2].

Что касается роли миелоидных супрессоров в трансплантационном иммунитете, ряд научных коллективов на моделях животных показали, что MDSC способствуют выживанию аллотрансплантатов при пересадке кожи, роговицы и сердца [15]. Помимо этого, есть данные о том, что процент реципиентов с 1- и 5-летней выживаемостью трансплантатов был выше в группе с высоким уровнем MDSC. По этой причине интерес к данным клеткам в качестве агентов клеточной терапии, способных улучшать приживаемость аллогенных трансплантатов, постоянно растет.

Важно подчеркнуть, что разработка терапевтических подходов, основанных на манипулировании MDSC, требует их выделения и/или пролиферации *in vitro*.

В основном получение миелоидных супрессоров человека с целью их исследования основано на выделении из крови онкологических больных либо на генерации из стволовых клеток. Однако сбор стволовых клеток костного мозга, как и забор крови у больных раком, сопряжен с этическими проблемами, поиском пациентов/доноров и получением добровольного информированного согласия.

На сегодняшний день имеются работы, описывающие более доступную *in vitro* индукцию MDSC из клеток периферической крови. В качестве факторов, индуцирующих дифференцировку MDSC вне организма человека, описаны GM-CSF, IL-6, IL-1β, IL-4, PGE2, LPS, M-CSF, IFNγ. Однако, несмотря на кажущееся разнообразие существующих вариантов, не все схемы однозначно воспроизводимы и приводят к генерации достаточного количества клеток целевой популяции.

Нами была разработана схема дифференцировки MDSC из CD11b⁺ клеток периферической крови человека [11], которая позволила получить осязаемый, но все же недостаточный для исследований функциональной активности процент клеток.

Поиск способов увеличения пула MDSC натолкнул нас на исследования, касающиеся дедифференцировки моноцитов и получения

программируемых клеток моноцитарного происхождения [13].

Моноциты периферической крови по сути являются клетками-предшественниками, которые при соответствующей стимуляции мигрируют к местам воспаления и проникают в ткани, приобретая характеристики активированных макрофагов. В качестве альтернативы они способны созреть в несколько классов резидентных тканевых макрофагов [4]. Описано несколько популяций культивируемых клеток человека, происходящих из циркулирующих моноцитов и обладающих способностью дифференцироваться в нефагоциты [8]. Ungefrogen H. и соавт. разработали протокол для получения из моноцитов человека «программируемых клеток моноцитарного происхождения» (ПКМО, РСМО), обладающих повышенной пластичностью. Во время 6-дневной дедифференцировки (обработки макрофагальным колониестимулирующим фактором (M-CSF) и интерлейкином-3 (IL-3)) клетки подавляли экспрессию ряда маркеров, связанных с иммунными функциями моноцитов, таких как CD14, TLR-2, TLR-4, TLR-7, TLR-9, а также цитозольной субъединицы NADPH оксидазы p47phox. Кроме того, РСМО эндогенно экспрессировали различные маркеры эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) человека и были способны индуцироваться при наличии соответствующих сигналов в клетки, напоминающие эндотелиоциты, хондроциты и остеобласты.

Эти результаты показали, что в среде, содержащей соответствующие факторы роста, моноциты периферической крови могут быть, по крайней мере частично, перепрограммированы без экзогенного введения факторов плюрипотентности.

Таким образом, целью нашего исследования была дифференцировка MDSC из моноцитов периферической крови человека *in vitro* с целью получения достаточного количества клеток целевой популяции.

Материалы и методы

Исследование проводилось в соответствии с Хельсинкской декларацией ВМА 2000 г. и Протоколом к Конвенции Совета Европы о правах человека и биомедицине 1999 г. На используемую экспериментальную схему получено одобрение Комитета по этике ИЭГМ УрО РАН (IRB00010009) от 15 февраля 2022 г., протокол № 15. У всех пациентов было получено письменное информированное согласие.

Объект исследования. Образцы венозной крови были взяты у здоровых доноров (небеременные женщины, n = 4, возраст 25-39 лет) путем венопункции с помощью вакуумных пробирок BD Vacutainer™, Greiner-bio-one, Австрия). Мо-

нонуклеарные клетки периферической крови (МПК) выделяли методом центрифугирования в градиенте плотности ($\rho = 1,077 \text{ г/см}^3$, «Диаколл», «Диаэм», Россия).

Дифференцировка CD14⁺ клеток. CD14⁺ клетки выделяли из МПК с помощью позитивной иммуномагнитной сепарации (MacsBeads, колонки MS, (Miltenyi Biotec, Германия)). Выделенные CD14⁺ клетки культивировали в 96-луночных планшетах (1×10^6 клеток/мл, 200 мкл) в полной питательной среде (среда RPMI 1640 (Sartorius) с добавлением 10 mM HEPES, 2 mM L-глутамина (оба из ICN Pharmaceuticals, США), пенициллин-стрептомицин-амфотерицина В (BI, Израиль)) и 10% инактивированной эмбриональной телячьей сыворотки (Corning, США) во влажной атмосфере в CO₂ – инкубаторе при 37°C и 5% CO₂ в течение 14 дней с 3-кратной заменой среды. Чтобы поляризовать CD14⁺ в клетки MDSC, на первом этапе мы культивировали клетки в течение 6 дней в среде для дедифференцировки, состоящей из среды RPMI 1640 с 50 мкмоль/мл β-меркаптоэтанола (для удаления активных форм кислорода), 5 нг/мл M-CSF и 0,4 нг/мл человеческого IL-3. На 4-й день среду заменяли на свежую [13]. На 7-й день проводили замену среды на среду RPMI 1640 с добавлением 20 нг/мл GM-CSF. На 10-й день вновь осуществляли смену среды на среду RPMI 1640 с добавлением 20 нг/мл IL-1β и 0,1 мкг/мл LPS [11].

На 14-й день культивирования осуществляли снятие культур и окрашивание клеток. Жизнеспособность клеток после 14-дневной инкубации оценивали с помощью окрашивания устойчивым к фиксации красителем Zombie Aqua (ZA) (Invitrogen, США). Подготовку образцов для окрашивания поверхностных клеточных молекул проводили в соответствии с инструкциями производителя антител (R&D, США).

Использовали следующую панель антител для поверхностного окрашивания: анти-HLA-DR-Alexa Fluor 750, анти-CD33-APC, анти-CD11b-Alexa Fluor 405, анти-CD66b-PE, анти-CD14-PerCP (R&D Systems, США). Для исключения лимфоцитов и NK-клеток из целевого гейта использовали антитела: анти-CD19-AF700, анти-CD56-AF700, анти-CD3-AF700. Пробоподготовку для внутриклеточного окрашивания проводили при помощи реагентов BioLegend (США). Для детекции внутриклеточных аргиназы-1 (Arg 1) и индоламин 2,3-диоксигеназы (ИДО) использовали антитела и изотипические контроли Anti-human/mouse Arginase 1-Alexa Fluor 488 и Rat IgG 2a Kappa isotype control – Alexa Fluor 488, Invitrogen; Anti human IDO (AF488) и mouse IgG1 control (AF488), R&D Systems (Biotechne, США). Пробы FMO (fluorescence

minus one) и изотипические контроли использовались для разделения «негативных» и «позитивных» популяций. Образцы анализировали на проточном цитометре CytoFLEX S (Beckman Coulter, США). Определяли процент общей популяции MDSC (Lin⁻HLA-DR⁺CD11b⁺CD33⁺) от живых клеток, а также процент M-MDSC (Lin⁻HLA-DR⁺CD11b⁺CD33⁺CD14⁺CD66b⁻) и PMN-MDSC (Lin⁻HLA-DR⁺CD11b⁺CD33⁺CD66b⁺CD14⁺) от всех MDSC. После гейтирования ZA-Lin⁻CD11b⁺CD33⁺ клеток на отдельных гистограммах определяли процент Arg⁺ и IDO⁺ клеток.

Данные проточной цитометрии обрабатывали с помощью программы CytExpert (Beckman Coulter, США). Статистическую обработку данных проводили в программе GraphPad Prism 8.0.1 с использованием критерия Манна–Уитни. Результаты представлены в виде медианы, нижнего квартиля и верхнего квартиля – Me (Q_{0,25}-Q_{0,75}). Уровень значимости был принят за 0,05.

Результаты и обсуждение

Обнаружено, что дифференцировка MDSC из CD14⁺ клеток сопровождалась статистически значимым, но незначительным снижением жизнеспособности клеток в культуре. Зафиксировано снижение процента живых клеток по сравнению с предыдущей схемой дифференцировки MDSC с 98,32 (97,88-98,71) в культуре CD11b⁺ клеток до 97,28 (96,15-97,86) в культуре (p = 0,024).

В среднем относительное количество клеток, которые можно отнести к общей популяции MDSC, в новой схеме дифференцировки из CD14⁺ клеток было выше, чем в эксперименте с CD11b⁺ клетками. Максимальный процент HLA-DR⁺Lin⁻CD11b⁺CD33⁺ клеток достигал 67, в то время как в предыдущей схеме – только 43. Тем не менее статистически значимых отличий по этому показателю между двумя схемами выявлено не было (табл. 1).

Процент клеток, содержащих Arg 1 и ИДО также имел тенденцию к повышению в куль-

турах, содержащих CD14⁺ клетки в качестве предшественников MDSC. Однако процент PMN-MDSC, который и в предыдущей схеме был крайне невысоким, в новой модели имел тенденцию к снижению (табл. 1).

Процент «зрелых» M-MDSC, т. е. HLA-DR⁺CD33⁺CD11b⁺ клеток, несущих на поверхности молекулу CD14, в схеме дифференцировки супрессоров из моноцитов периферической крови был в среднем выше в 3 раза, чем в модели получения MDSC из CD11b⁺ клеток (рис. 1). Важно отметить, что, процент M-MDSC был сопоставим с количеством клеток, содержащих Arg 1 и ИДО, что является подтверждением их функциональной состоятельности.

Как мы уже упоминали, получение функционально активных MDSC *in vitro* имеет большую практическую значимость для разработки клеточных технологий, использующих иммунорегуляторную способность этих клеток для терапии аутоиммунных патологий и посттрансплантационных осложнений.

С момента первых работ, описывающих миелоидные супрессоры, прошло более сорока лет. С начала двухтысячных годов ведутся исследования по получению MDSC в лабораторных условиях. Помимо дифференцировки супрессоров из стволовых клеток описаны методы их генерации из клеток крови *in vitro* с добавлением различных цитокинов и ростовых факторов, а также при сокультивировании с опухолевыми линиями клеток [9].

Ранее нашим коллективом были опробованы методы генерации MDSC из разных типов клеток периферической крови. В качестве клеток-предшественников мы использовали мононуклеары периферической крови, изолированные CD33⁺ и CD11b⁺ клетки. В качестве молекул индукции – GM-CSF, IL-1β, IL-6, LPS, IFNγ. Время инкубации варьировало от одной недели до трех недель [11].

ТАБЛИЦА 1. ПРОЦЕНТ MDSC, PMN-MDSC И MDSC, СОДЕРЖАЩИХ Arg1 И ИДО В КУЛЬТУРАХ CD11b⁺ И CD14⁺ КЛЕТОК, ИНДУЦИРОВАННЫХ В МИЕЛОИДНЫЕ СУПРЕССОРЫ; n = 4, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 1. PERCENTAGE OF MDSC, PMN-MDSC AND MDSC CONTAINING Arg1 AND IDO IN CULTURES OF CD11b⁺ AND CD14⁺ CELLS INDUCED INTO MYELOID-DERIVED SUPPRESSOR CELLS; n = 4, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

Источник Source	MDSC %	PMN-MDSC %	Arg1 ⁺ Arg 1 ⁺ %	ИДО ⁺ IDO ⁺ %
CD11b ⁺ клетки CD11b ⁺ cells	34,21 (11,79-43,29)	2,155 (0,26-7,87)	39,49 (33,80-45,33)	43,59 (34,53-57,55)
CD14 ⁺ клетки CD11b ⁺ cells	39,75 (22,21-66,75)	0,815 (0,475-1,935)	50,5 (45,36-56,43)	60,54 (47,76-69,97)

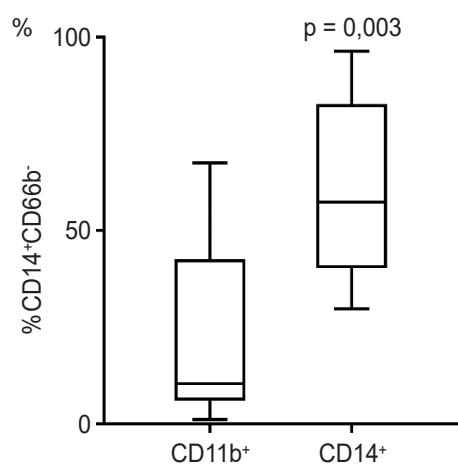


Рисунок 1. Процент М-MDSC от общей популяции MDSC, полученных из CD14⁺ клеток

Примечание. n = 4; по оси абсцисс – вид клеток, из которых дифференцировали MDSC; по оси ординат – процент М-MDSC в гейте общей популяции миелоидных супрессоров. Показаны медианы (горизонтальные линии), межквартильные размахи (прямоугольники), максимальные и минимальные значения («усы»). Указано значение $p < 0,05$ по отношению к культурам CD11b⁺ клеток.

Figure 1. Percentage of M-MDSCs from the total population of MDSCs derived from CD14⁺ cells

Note. n = 4; x axis, the type of cells from which MDSC was differentiated; y-axis, percentage of M-MDSC in the gate of the total population of myeloid suppressors. Medians (horizontal lines), interquartile ranges (rectangles), maximum and minimum values (“whiskers”) are shown. The $p < 0.05$ value is indicated in relation to CD11b⁺ cell cultures.

В целом по увеличению процента выхода целевой популяции клеток в наших экспериментальных культурах можно выстроить клетка-предшественники MDSC следующим образом: мононуклеары периферической крови – CD33⁺ клетки – CD11b⁺ клетки – CD14⁺ клетки. Однако

нужно понимать, что однозначный вывод можно сделать только устранив вариации во времени культивирования, в добавляемых молекулах-индукторах и их концентрациях. Но все же можно выделить общую для всех использованных нами схем тенденцию. Во всех культурах клеток количество М-MDSC превышало количество PMN-MDSC, причем иногда в более чем в десять раз. Можно предположить, что для дифференцировки PMN-MDSC в наших экспериментальных условиях необходимо наличие менее зрелого костномозгового миелоидного предшественника. Интересно, что у больных раком людей и у животных с опухолями PMN-MDSC способны дифференцироваться из М-MDSC, за что ответственно эпигенетическое подавление транскрипции гена ретинобластомы Rb1 [14].

Отличия М-MDSC от PMN-MDSC, которые можно назвать преимуществами для биомедицинских исследований, касающихся индукции толерантности к трансплантату, в том, что они не требуют прямого контакта с Т-клетками для подавления их иммунного ответа, а их супрессивное действие является неспецифическим. Кроме того, есть данные, что М-MDSC в пересчете на одну клетку эффективнее PMN-MDSC. Еще одной важной особенностью М-MDSC является их способность поддерживать размножение регуляторных Т-клеток *in vitro* [7].

Заключение

Таким образом, нами разработана эффективная методика получения достаточного количества функционально активных М-MDSC из моноцитов периферической крови в количестве, позволяющем проводить дальнейшие исследования по манипулированию функциями этих клеток.

Список литературы / References

1. Шардина К.Ю., Заморина С.А., Раев М.Б., Черешнев В.А. Роль миелоидных супрессорных клеток в процессах формирования иммунной толерантности в период беременности // Цитология, 2022. Т. 64, № 2. С. 116-125. Shardinina K. Yu., Zamorina S. A., Rayev M. B., Chereshev V. A. The role of myeloid suppressor cells in the processes of formation of immune tolerance during pregnancy. *Tsitologiya = Cytology*, 2022, Vol. 64, no. 2, pp. 116-125. (In Russ.)
2. Crook K.R., Liu P. Role of myeloid-derived suppressor cells in autoimmune disease. *World J. Immunol.*, 2014, Vol. 4, no. 1, pp. 26-33.
3. Fainaru O., Hantisteanu S., Hallak M. Immature myeloid cells accumulate in mouse placenta and promote angiogenesis. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 2011, Vol. 204, no. 6, pp. 544.e18-544e23.
4. Gordon S., Taylor P.R. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat. Rev. Immunol.*, 2005, Vol. 5, no. 12, pp. 953-964.
5. Ibanez-Vea M., Zuazo M., Gato M., Arasanz H., Fernandez-Hinojal G., Escors D., Kochan G. Myeloid-derived suppressor cells in the tumor microenvironment: current knowledge and future perspectives. *Arch. Immunol. Ther. Exp.*, 2018, Vol. 66, pp. 113-123.

6. Köstlin N., Kugel H., Spring B., Leiber A., Marmé A., Henes M., Rieber N., Hartl D., Poets C.F., Gille C. Granulocytic myeloid derived suppressor cells expand in human pregnancy and modulate T-cell responses. *Eur. J. Immunol.*, 2014, Vol. 44, no. 9, no. 2582-2591.
7. Kumar V., Patel S., Tcyganov E., Gabrilovich D.I. The nature of myeloid-derived suppressor cells in the tumor microenvironment. *Trends Immunol.*, 2016, Vol. 37, no. 3, pp. 208-220.
8. Kuwana M., Okazaki Y., Kodama H., Izumi K., Yasuoka H., Ogawa Y., Kawakami Y., Ikeda Y. Human circulating CD14⁺ monocytes as a source of progenitors that exhibit mesenchymal cell differentiation. *J. Leukoc. Biol.*, 2003, Vol. 74, no. 5, pp. 833-845.
9. Lechner M.G., Megiel C., Russell S.M., Bingham B., Arger N., Woo T., Epstein A.L. Functional characterization of human Cd33⁺ and Cd11b⁺ myeloid-derived suppressor cell subsets induced from peripheral blood mononuclear cells co-cultured with a diverse set of human tumor cell lines. *J. Transl. Med.*, 2011, Vol. 9, 90. doi: 10.1186/1479-5876-9-90.
10. Sanchez-Pino M.D., Dean M.J., Ochoa A.C. Myeloid-derived suppressor cells (MDSC): When good intentions go awry. *Cell Immunol.*, 2021, Vol. 362, 104302. doi: 10.1016/j.cellimm.2021.104302.
11. Shardina K., Timganova V., Bochkova M., Uzhviyuk S.. Generation of human myeloid-derived suppressor cells from CD11b⁺ Cells *in vitro*. In: Isaeva, E., Rocha, Á. (eds) Science and Global Challenges of the 21st Century – Innovations and Technologies in Interdisciplinary Applications. Perm Forum 2022. Lecture Notes in Networks and Systems, 2023, Vol 622. Springer, Cham.
12. Umansky V., Blattner C., Gebhardt C., Utikal J. The role of myeloid-derived suppressor cells (MDSC) in cancer progression. *Vaccines*, 2016, Vol. 4, no. 4, 36. doi: 10.3390/vaccines4040036.
13. Ungefroren H., Fändrich F. The programmable cell of monocytic origin (PCMO): a potential adult stem/progenitor cell source for the generation of islet cells. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2010, Vol. 654, pp. 667-682.
14. Youn J.I., Kumar V., Collazo M., Nefedova Yu., Condamine T., Cheng P., Villagra A., Antonia S., McCaffrey J.C., Fishman M., Sarnaik A., Horna P., Sotomayor E., Gabrilovich D.I. Epigenetic silencing of retinoblastoma gene regulates pathologic differentiation of myeloid cells in cancer. *Nat. Immunol.*, 2013, Vol. 14, pp. 211-220.
15. Zhang W., Li J., Qi G., Tu G., Yang C., Xu M. Myeloid-derived suppressor cells in transplantation: the dawn of cell therapy. *J. Transl. Med.*, 2018, Vol. 16, 19. doi: 10.1186/s12967-018-1395-9.

Авторы:

Тимганова В.П. – к.б.н., научный сотрудник лаборатории клеточной иммунологии и нанобиотехнологии, Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук – филиал ФГБУН «Пермский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук», г. Пермь, Россия

Шардина К.Ю. – инженер-исследователь лаборатории клеточной иммунологии и нанобиотехнологии, Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук – филиал ФГБУН «Пермский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук», г. Пермь, Россия

Authors:

Timganova V.P., PhD (Biology), Research Associate, Laboratory of Cellular Immunology and Nanobiotechnology, Institute of Ecology and Genetic of Microorganisms, Perm Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation

Shardina K.Yu., Research Assistant, Laboratory of Cellular Immunology and Nanobiotechnology, Institute of Ecology and Genetic of Microorganisms, Perm Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation

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», г. Пермь, Россия

Bochkova M.S., PhD (Biology), Research Associate, Laboratory of Cellular Immunology and Nanobiotechnology, Institute of Ecology and Genetic of Microorganisms, Perm Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation

Усанина Д.И. — 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

Usanina D.I., Research Assistant, Laboratory of Cellular Immunology and Nanobiotechnology, Institute of Ecology and Genetic of Microorganisms, Perm Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation

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», г. Пермь, Россия

Zamorina S.A., PhD, MD (Biology), Leading Research Associate, Laboratory of Cellular Immunology and Nanobiotechnology, Institute of Ecology and Genetic of Microorganisms, Perm Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation

Поступила 10.07.2023
Принята к печати 12.07.2023

Received 10.07.2023
Accepted 12.07.2023

ИММУНОМОДУЛИРУЮЩИЙ ЭФФЕКТ КОМПЛЕКСОВ миРНК *IN VITRO* ПРИ ГРИППОЗНОЙ ИНФЕКЦИИ

Пашков Е.А.^{1,2}, Самойликов Р.В.¹, Пряников Г.А.², Быков А.С.²,
Пашков Е.П.², Поддубиков А.В.¹, Свитич О.А.^{1,2}, Зверев В.В.^{1,2}

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. Ежегодно регистрируется ~ 1,2 млрд случаев гриппозной инфекции, до 5 млн случаев тяжелого течения заболевания и до 650 000 смертей от гриппа и его осложнений. Высокие показатели заболеваемости и смертности обусловлены тем, что вирусы гриппа обладают белками, обеспечивающими им наличие иммуномодулирующих свойств. Среди подобных белков наиболее изученным является NS-1. Одной из его основных функций является нарушение функционирования интерферон-опосредованных механизмов защиты организма, из-за чего снижается выработка ряда компонентов гуморального иммунитета, что приводит к недостаточности иммунного ответа. Известно, что миРНК, направленные к клеточным генам, чьи продукты экспрессии принимают участие в процессе вирусной репродукции, обладают выраженной противовирусной активностью. При этом на сегодняшний день проведено мало исследований, посвященных оценке их иммуотропного эффекта. Исходя из этого, целью настоящего исследования является количественная оценка концентрации цитокинов IFN α , IFN γ , TNF α и IL-10 в результате комплексного подавления активности клеточных генов FLT4, Nup98 и Nup205, чьи продукты экспрессии играют важную роль в репродукции вируса гриппа.

Было показано, что применение комплексов миРНК также приводит к повышению концентрации IFN α , IFN γ , TNF α и IL-10. Продукция IL-10 отсутствует в первые сутки после заражения, однако начинает увеличиваться на вторые и третьи сутки. Параллельно с этим, в некоторых случаях наблюдается повышение концентрации IFN α и IFN γ на первые сутки после заражения, однако к третьим суткам наблюдается снижение их концентрации. Это свидетельствует о том, что на фоне применения комплексов миРНК под воздействием IL-10 происходит нормализация цитокинового профиля.

Ключевые слова: IFN α , IFN γ , TNF α , IL-10, цитокины, экспрессия генов, грипп, РНК-интерференция, миРНК

Адрес для переписки:

Пашков Евгений Алексеевич
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова»
105064, Россия, Москва, Малый Казенный пер., 5а.
Тел.: 8 (916) 228-73-53.
E-mail: pashckov.j@yandex.ru

Address for correspondence:

Evgeny A. Pashkov
I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera
5a Malyy Kazenny Ave
Moscow
105064 Russian Federation
Phone: +7 (916) 228-73-53.
E-mail: pashckov.j@yandex.ru

Образец цитирования:

Е.А. Пашков, Р.В. Самойликов, Г.А. Пряников,
А.С. Быков, Е.П. Пашков, А.В. Поддубиков,
О.А. Свитич, В.В. Зверев «Иммуномодулирующий
эффект комплексов миРНК *in vitro* при гриппозной
инфекции» // Российский иммунологический журнал,
2023. Т. 26, № 4. С. 457-462.
doi: 10.46235/1028-7221-13984-IVI

© Пашков Е.А. и соавт., 2023

Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

E.A. Pashkov, R.V. Samoilikov, G.A. Pryanikov, A.S. Bykov,
E.P. Pashkov, A.V. Poddubikov, O.A. Svitich, V.V. Zverev
“In vitro immunomodulatory effect of siRNA complexes in
the influenza infection”, Russian Journal of Immunology/
Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2023, Vol. 26, no. 4,
pp. 457-462.
doi: 10.46235/1028-7221-13984-IVI

© Pashkov E.A. et al., 2023

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

DOI: 10.46235/1028-7221-13984-IVI

IN VITRO IMMUNOMODULATORY EFFECT OF siRNA COMPLEXES IN THE INFLUENZA INFECTION

Pashkov E.A.^{a,b}, Samoilikov R.V.^a, Pryanikov G.A.^b, Bykov A.S.^b,
Pashkov E.P.^b, Poddubikov A.V.^a, Svitich O.A.^{a,b}, Zverev V.V.^{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. About 1.2 billion cases of influenza infection with up to 5 million cases of severe disease and up to 650,000 deaths from influenza and its complications are registered annually worldwide. High rates of morbidity and mortality are attributed to immunomodulatory properties of some proteins produced by the influenza viruses. Among these proteins, NS-1 is the most studied. One of its main functions is to disrupt the functioning of interferon-mediated defense mechanisms of the body thus causing suppressed production of different components of humoral immunity, which leads to an insufficiency of the immune response. It is known that miRNAs directed to cellular genes, which are involved in the process of viral reproduction, showing a pronounced antiviral activity. At the same time, only few studies have been focused on evaluation of their immunotropic effects. Therefore, the aim of our study was to quantify the concentrations of IFN α , IFN γ , TNF α and IL-10 cytokines as a result of complex suppression of the cellular FLT4, Nup98 and Nup205 gene activity, whose expression products play an important role in the reproduction of the influenza virus.

We have shown that the use of siRNA complexes also leads to an increase in the IFN α , IFN γ , TNF α and IL-10 concentrations. IL-10 production is absent on the first day after infection, but begins to increase on the second and third days. Moreover, in some cases, there is an increase in IFN α and IFN γ concentration on the first day after infection followed by decrease in their concentrations by the third day. This finding indicates that, upon supplement of the siRNA complexes, the cytokine profile is normalized under the influence of IL-10.

Keywords: IFN α , IFN γ , TNF α , IL-10, cytokines, gene expression, influenza, RNAi, siRNA

Введение

Грипп – высококонтагиозная вирусная инфекция, связанная с ежегодными вспышками и эпидемиями, протекающими, как правило в осенне-зимний период. Ежегодно регистрируется ~ 1,2 млрд случаев гриппозной инфекции, до 5 млн случаев тяжелого течения заболевания и до 650 000 смертей от гриппа и его осложнений [1]. Высокие показатели заболеваемости и смертности обусловлены тем, что вирусы гриппа обладают белками, обеспечивающими им наличие иммуномодулирующих свойств.

Среди подобных белков наиболее изученным является NS-1. Одной из его основных функций является нарушение функционирования интерферон-опосредованных механизмов защиты организма, из-за чего снижается выработка ряда компонентов гуморального иммунитета, что приводит к недостаточности иммунного ответа. При этом важнейшими участниками противогриппозного иммунитета являются цитокины IFN α , IFN γ , TNF α и IL-10, чья активность также может быть снижена под воздействием белка NS-1 [8].

IFN α и TNF α играют важную роль на ранних стадиях вирусной инфекции. Было показано, что TNF α обладает противовирусной активностью в

эпителиальных клетках легких [4]. IFN α , в свою очередь, индуцирует продукцию IFN γ в NK- и Т-клетках и стимулирует их цитотоксическую способность [7, 9]. IL-10 является основным противовоспалительным цитокином, чьей функцией является регуляция и предотвращение избыточной воспалительной реакции, которая может [6].

В настоящее время существует широкий ряд препаратов, применяющихся для противогриппозной терапии, однако достижение полного терапевтического эффекта от применения этих лекарственных средств представляется затруднительным из-за появления новых резистентных форм вируса гриппа [6].

Одной из перспективных технологий для преодоления данной проблемы является создание специфических противовирусных препаратов основана на механизме РНК-интерференции [1].

РНК-интерференция – процесс нарушения экспрессии целевого гена с помощью молекулы малой интерферирующей РНК (миРНК, siRNA).

Исходя из вышесказанного, целью настоящего исследования является оценка динамики количественная оценка концентрации цитокинов IFN α , IFN γ , TNF α и IL-10 в результате комплексного подавления активности клеточных генов FLT4,

Nup98 и Nup205, чьи продукты экспрессии играют важную роль в репродукции вируса гриппа.

Материалы и методы

Подбор миРНК, олигонуклеотидов, комплексы миРНК, использованные в работе, методика трансфекции клеток миРНК с последующим заражением, использованные в работе, методика титрования вируса по конечной точке цитопатического действия представлены в нашем более раннем исследовании [1].

В работе использован вирус гриппа A/WSN/33 (H1N1) (St. Jude's Children's Research Hospital, США). Культивирование и определение титра вируса проводилось на культуре клеток MDCK. Для заражения использовали множественность инфицирования (мн.з., MOI), равную 0,1; 0,01 и 0,001 ед. В работе использовались клетки почек кокер-спаниеля MDCK (Institut Pasteur, Франция) и клетки аденокарциномы человеческого легкого A549 (ATCC, США). Клетки MDCK выращивали в среде MEM («ПанЭко», Россия), содержащей 5% эмбриональной сыворотки коров (ЭСК) Gibco (Fisher Scientific, Новая Зеландия), 40 мкг/мл гентамицина («ПанЭко», Россия), и 300 мкг/мл L-глутамин («ПанЭко», Россия) при 37 °C в CO₂-инкубаторе. Клетки A549 выращивали в среде DMEM («ПанЭко», Россия), содержащей 5% ЭСК, 40 мкг/мл гентамицина и 300 мкг/мл L-глутамин при 37 °C в CO₂-инкубаторе.

Для оценки динамики концентрации IFN α , IFN γ , TNF α и IL-10 в течение трех суток с момента трансфекции и заражения проводился отбор надосадочной жидкости. Измерение уровня указанных цитокинов выполнялось посредством иммуноферментного анализа с использованием ИФА-набора ELISA (АО «Вектор-Бест», Россия) согласно инструкции производителя. После проведения процедуры протокола в течение 10 последующих минут планшет с образцами помещали в ИФА-ридер ELX800 (BIO-TEK INSTRUMENTS INC., США) для получения первичных данных — значений длин волн (в диапазоне 450–620 нм).

Статистическую значимость полученных результатов определяли с помощью критерия Манна–Уитни. Разница считалась достоверной при уровне статистической значимости $0,01 \leq p \leq 0,05$. Показатели достоверности рассчитывались с использованием ПО Minitab.

Результаты и обсуждение

Было установлено, что наиболее эффективное повышение концентрации IFN α наблюдалось при трансфекции комплексов А и Б при MOI 0,01. При трансфекции комплекса А, концентрация IFN α нарастала ко вторым суткам и составляла 6,5 пг/мл, а на третьи сутки увеличивалась

до 7,1 пг/мл. При трансфекции комплекса Б рост концентрации IFN α наблюдался на третьи сутки и составлял 6,2 пг/мл. При использовании MOI 0,001 рост концентрации IFN α наблюдался на третьи сутки при использовании комплексов В и Г и составлял 7 пг/мл в обоих случаях. Наряду с этим, к третьим суткам также был отмечен рост концентрации IFN α при использовании комплекса А, который составил 5,8 пг/мл. При MOI 0,1 рост концентрации IFN α не наблюдался.

При оценке изменения концентрации IFN γ в течение трех суток с момента трансфекции были получены следующие результаты. При MOI 0,1 на вторые сутки наблюдался рост концентрации IFN γ во всех образцах, вне зависимости от их обработки комплексами миРНК. Концентрация IFN γ для вирусного и неспецифического контролей и комплекса Г в данном случае составила 3,5, 5,4 и 5,4 пг/мл соответственно. В случае применения комплексов А, Б и В, концентрация IFN γ ко вторым суткам составила 4, 4,7 и 4,7 пг/мл соответственно. К третьим суткам отмечалось полное снижение концентрации IFN γ в образцах с комплексом Г, а также с вирусным и неспецифическим контролями. В свою очередь, концентрация IFN γ в клетках A549, обработанных комплексами А, Б и В снижалась незначительно и составляла 3,9, 2,8 и 3,2 ($p \leq 0,05$).

На рисунке 1 (см. 2-ю стр. обложки) отображена динамика концентрации IFN γ при MOI 0,01 в течение трех суток с момента трансфекции. Было установлено, что достоверное повышение концентрации IFN γ по отношению к контрольным группам отмечалось на вторые и третьи сутки при использовании комплекса А и составляло 3,5 и 2,7 пг/мл соответственно.

При использовании MOI 0,001 рост концентрации IFN γ отмечался во всех образцах в течение трех суток с момента трансфекции. При этом не наблюдалось достоверной разницы между контрольными образцами и образцами, обработанными комплексами миРНК.

При оценке динамики уровня IL-10 в отобранных образцах, получены следующие результаты. При MOI 0,1 было установлено, что рост концентрации IL-10 к третьим суткам в тех группах образцов, которые были обработаны комплексами А и Б, составил 4,6 и 2,9 пг/мл соответственно ($p \leq 0,05$). На рисунке 1 (см. 2-ю стр. обложки) показано, что при использовании MOI 0,01, начиная со вторых суток, наблюдался достоверный рост концентрации IL-10 для всех образцов, обработанных комплексами миРНК относительно контрольных групп. На третьи сутки концентрация IL-10 при использовании комплекса А составила 1,5 пг/мл, для комплекса Б — 2,6 пг/мл, для комплексов В и Г — 3,2 и 3 пг/мл соответствен-

но ($p \leq 0,05$). Аналогичный результат отмечался и при MOI 0,001. Достоверный рост концентрации IL-10 по отношению к контрольным группам наблюдался при трансфекции всех комплексов миРНК, начиная со вторых суток с момента трансфекции. Концентрация IL-10 на третьи сутки в случае использования комплекса А составила 0,29 пг/мл, для комплекса Б – 1,7 пг/мл, для комплекса В – 2,5 пг/мл, для комплекса Г – 1 пг/мл ($p \leq 0,05$). Полученные данные представлены на рисунке 2 (см. 2-ю стр. обложки).

При оценке изменения концентрации TNF α были получены следующие результаты. При MOI 0,1 было установлено, что достоверное повышение концентрации TNF α относительно контрольных групп наблюдалось на вторые сутки после трансфекции комплексов А и Г и составило 8 и 10 пг/мл. При MOI 0,01 достоверное повышение концентрации TNF α отмечалось на третьи сутки аналогично при использовании комплексов А и В и составило 19,6 и 20 пг/мл соответственно. При использовании MOI 0,001 достоверного изменения концентрации TNF α по отношению к контрольным группам не наблюдалось.

Настоящая работа является исследованием, посвященным оценке влияния комплексного снижения экспрессии генов FLT4, Nup98 и Nup205 на изменение концентрации IFN α , IFN γ , TNF α и IL-10. Для оценки эффективности динамики уровня концентрации указанных цитокинов применялся метод иммуноферментного анализа. Было показано, что применение комплексов миРНК приводит к повышению концентрации IFN α , IFN γ , TNF α и IL-10. Важно отметить, что продукция IL-10 отсутствует в первые сутки после заражения, однако начинает увеличиваться на вторые и третьи сутки. Параллельно с этим, в некоторых случаях наблюдается повышение концентрации IFN α и IFN γ на первые сутки после заражения, однако к третьим суткам наблюдается снижение их концентрации. Это свидетельствует о том, что на фоне применения комплексов миРНК под воздействием IL-10 происходит нормализация цитокинового профиля.

Полученные результаты также свидетельствуют о том, что указанные комплексы миРНК являются лигандами для Toll-подобных рецепторов 3-го типа (TLR). Распознавание молекулярных паттернов вируса гриппа А посредством TLR стимулирует активацию фактора регуляции интерферона 3-го и 7-го типа (IRF3/7) посредством

фосфорилирования С-конца IRF3/7 и его димеризации [3]. Активация IRF3 и IRF7 индуцирует выработку TNF α , который во время инфекции запускает каскад реакций, направленных на стимуляцию высвобождения IL-1 и IL-6, а также координирует свои действия с другими иммунными регуляторами, такими как IL-2, IL-8 и, в особенности, IFN α [2, 4]. IFN γ может активировать образование IFN-индуцированного трансмембранного белка 3 (IFITM3), ингибирующего проникновение вирусного рибонуклеопротеина в клетку из эндосомы, путем блокировки слияния вирусной оболочки с эндосомальной мембраной [2]. На более поздних стадиях инфекции, вызванной вирусом гриппа А, обнаруживается IL-10, который обеспечивает защиту от цитокинового шторма, блокируя продукцию цитокинов и снижая активность МНС класса II [5, 10]. Исходя из этого, функция выбранных нами цитокинов является предельно важной для иммунного ответа организма на инфекцию вируса гриппа А. Важно учитывать, что наличие белка NS-1 у вируса гриппа обуславливает нарушение активности механизмов врожденного иммунитета, включающих и те, которые рассматриваются в настоящем исследовании [6]. Применение миРНК, направленных на клеточные гены FLT4, Nup98 и Nup205, нарушает цикл вирусной репродукции и, как следствие, вызывает дисфункцию белка NS-1. На фоне этого наблюдается активация и последующая выработка IFN α , IFN γ , TNF α и IL-10.

Заключение

Здесь мы показываем, что при использовании миРНК наблюдается увеличение концентрации исследуемых цитокинов. Это свидетельствует о том, что препараты миРНК способны обладать не только противовирусным эффектом, но также и иммуностимулирующим, посредством их взаимодействия с TLR.

Благодарности

Авторы выражают благодарность центру коллективного пользования НИИВС им. И.И. Мечникова. Исследование выполнено с использованием научного оборудования центра коллективного пользования «НИИВС им. И.И. Мечникова» – при финансовой поддержке проекта Российской Федерацией в лице Министерства образования и науки России, Соглашение № 075-15-2021-676 от 28.07.2021.

Список литературы / References

1. Пашков Е.А., Пак А.В., Абрамова Н.Д., Яковлева И.В., Вартанова Н.О., Богданова Е.А., Пашков Е.П., Свитич О.А., Зверев В.В. Изучение экспрессии гена IL-1 β под действием комплексов миРНК, обладающих противогриппозным действием // Российский иммунологический журнал, 2022. № 4. С. 485-490. [Pashkov E.A., Pak A.V., Abramova N.D., Yakovleva I.V., Vartanova N.O., Bogdanova E.A., Pashkov E.P., Svitich O.A., Zverev V.V. Studying expression of IL-1 β gene under the action of siRNA complexes with anti-influenza effect.

Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology, 2022, Vol. 25, no. 4, pp. 485-490. (In Russ.)
doi: 10.46235/1028-7221-1202-SEO.

2. Fong C., Lu L., Chen L., Yeung M., Zhang A., Zhao H., Yuen K., To K. Interferon-gamma inhibits influenza A virus cellular attachment by reducing sialic acid cluster size. *iScience*, 2022, Vol. 25, no. 4, pp. 1-27.
3. Hayden M., Ghosh S. Shared principles in NF-kappaB signaling. *Cell*, 2008, Vol. 132, no. 4, pp. 344-362.
4. Hou Y., Wang Y., Chen J., Chen C. Dual roles of tumor necrosis factor superfamily 14 in antiviral immunity. *Viral Immunol.*, 2022, Vol. 35, no. 9, pp. 579-585.
5. Jordan S. Innate and adaptive immune responses to SARS-CoV-2 in humans: relevance to acquired immunity and vaccine responses. *Clin. Exp. Immunol.*, 2021. Vol. 204, no. 3, pp. 310-320.
6. Lampejo T. Influenza and antiviral resistance: an overview. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 2020, Vol. 39, no. 7, pp. 1201-1208.
7. Matikainen S., Paananen A., Miettinen M., Kurimoto M., Timonen T., Julkunen I., Sareneva T. IFN-alpha and IL-18 synergistically enhance IFN-gamma production in human NK cells: differential regulation of Stat4 activation and IFN-gamma gene expression by IFN-alpha and IL-12. *Eur. J. Immunol.*, 2001, Vol. 31, no. 7, pp. 2236-2245.
8. Plotnikova M., Klotchenko S., Vasin A. Development of a multiplex quantitative PCR assay for the analysis of human cytokine gene expression in influenza A virus-infected cell. *J. Immunol. Methods*, 2016, Vol. 430, pp. 51-55.
9. Sareneva T., Matikainen S., Kurimoto M., Julkunen I. Influenza A virus-induced IFN-alpha/beta and IL-18 synergistically enhance IFN-gamma gene expression in human T cells. *J. Immunol.*, 1998, Vol. 160, no. 12, pp. 6032-6038.
10. Wang X., Wong K., Ouyang W., Rutz S. Targeting IL-10 Family Cytokines for the Treatment of Human Diseases. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, 2019, Vol. 11, no. 2, a028548. doi: 10.1101/cshperspect.a028548.

Авторы:

Пашков Е.А. — младший научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова»; ассистент кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии ИОЗ имени Ф.Ф. Эрисмана ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ (Сеченовский университет), Москва, Россия

Самойликов Р.В. — научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

Пряников Г.А. — аспирант кафедры эпидемиологии и доказательной медицины ИОЗ имени Ф.Ф. Эрисмана ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ (Сеченовский университет), Москва, Россия

Быков А.С. — д.м.н., профессор кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии ИОЗ имени Ф.Ф. Эрисмана ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ (Сеченовский университет), Москва, Россия

Authors:

Pashkov E.A., Junior Research Associate, Laboratory of Molecular Immunology, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera; Assistant Professor, Department of Microbiology, Virology and Immunology, I. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation

Samoilikov R.V., Research Associate, Laboratory of Molecular Immunology, I. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation

Pryanikov G.A., Postgraduate Student, Department of Epidemiology and Evidence-based Medicine, I. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation

Bykov A.S., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Microbiology, Virology and Immunology, I. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation

Пашков Е.П. — д.м.н., профессор кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии ИОЗ имени Ф.Ф. Эрисмана ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ (Сеченовский университет), Москва, Россия

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

Свитич О.А. — д.м.н., член-корр. РАН, заведующая лабораторией молекулярной иммунологии, директор ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова»; профессор кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ (Сеченовский университет), Москва, Россия

Зверев В.В. — д.б.н., академик РАН, научный руководитель ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова»; профессор, заведующий кафедрой микробиологии, вирусологии и иммунологии ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ (Сеченовский университет), Москва, Россия

Pashkov E.P., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Microbiology, Virology and Immunology, I. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation

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

Svitich O.A., PhD, MD (Medicine), Corresponding Member, Russian Academy of Sciences, Director, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera; Professor, Department of Microbiology, Virology and Immunology, I. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation

Zverev V.V., PhD, MD (Biology), Full Member, Russian Academy of Sciences, Scientific Advisor, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera; Professor, Department of Microbiology, Virology and Immunology, I. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation

Поступила 10.07.2023
Принята к печати 12.07.2023

Received 10.07.2023
Accepted 12.07.2023

ОПИСАНИЕ ТЕРАПЕВТИЧЕСКОГО ЭФФЕКТА НОВОЙ ИММУНОТРОПНОЙ КОМПОЗИЦИИ В МОДЕЛИ ПАРОДОНТИТА У ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ

Хлыстова К.А.¹, Чумаков Н.С.¹, Саркисян Н.Г.^{1,2}, Катаева Н.Н.²,
Дроздова Л.И.³, Тузанкина И.А.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 ФГБОУ ВО «Уральский государственный аграрный университет», г. Екатеринбург, Россия

Резюме. В статье рассматриваются вопросы использования новой иммунотропной композиции в модели пародонтита у экспериментальных животных. Композиция, содержащая пептид и кремний-органический глицерогидрогель, обладает широким спектром действия и транскутанной активностью, оказывает хорошее воздействие на этиологический фактор заболевания. По результатам клинических, лабораторных и гистологических исследований отмечался хороший терапевтический эффект. Это подтверждалось гистологически отсутствием остеокластов, уменьшением лакун, уплотнением и нормализацией структуры ткани, восстановлением микроциркуляторного русла, формированием сосудов и грануляционной ткани.

Однако в группе, лечение которой было дополнено пероральным введением витамина D3, биохимические показатели, описывающие фосфорно-кальциевое соотношение, отличались достоверным снижением количества щелочной фосфатазы и неорганического фосфора. Что подтверждает эффективность комплексного действия применяемой топической композиции и витамина.

Ключевые слова: хронический пародонтит, стероидный остеопороз, витамин D3, иммунотропные пептиды, глицерогидрогель кремния

Адрес для переписки:

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

Address for correspondence:

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

Образец цитирования:

К.А. Хлыстова, Н.С. Чумаков, Н.Г. Саркисян, Н.Н. Катаева, Л.И. Дроздова, И.А. Тузанкина «Описание терапевтического эффекта новой иммунотропной композиции в модели пародонтита у экспериментальных животных» // Российский иммунологический журнал, 2023. Т. 26, № 4. С. 463-470. doi: 10.46235/1028-7221-13532-TEO

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

For citation:

K.A. Khlystova, N.S. Chumakov, N.G. Sarkisyan, N.N. Kataeva, L.I. Drozdova, I.A. Tuzankina "Therapeutic effect of a new immunotropic composition tested in the model of periodontitis in experimental animals", Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskiy Zhurnal, 2023, Vol. 26, no. 4, pp. 463-470. doi: 10.46235/1028-7221-13532-TEO

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

DOI: 10.46235/1028-7221-13532-TEO

THERAPEUTIC EFFECT OF A NEW IMMUNOTROPIC COMPOSITION TESTED IN THE MODEL OF PERIODONTITIS IN EXPERIMENTAL ANIMALS

Khlystova K.A.^a, Chumakov N.S.^a, Sarkisyan N.G.^{a,b}, Kataeva N.N.^b, Drozdova L.I.^c, Tuzankina I.A.^a

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

^b Ural State Medical University, Yekaterinburg, Russian Federation

^c Ural State Agrarian University, Yekaterinburg, Russian Federation

Abstract. The article deals with usage of a novel immunotropic drug composition in experimental model of periodontitis. The composition contains silicoorganic glycerogel, exhibits broad spectrum of action upon the etiological pathogen. A good therapeutic effect was revealed by clinical, laboratory and histological criteria. Histology showed absence of osteoclasts, reduced lacunas, higher density and normalization of tissue structures, recovery of microcirculation, angiogenesis and formation of granulation tissues. However, the phosphorus-to-calcium ratio in the group supplied with peroral vitamin D treatment, was characterized by significant decrease in alkaline phosphatase and inorganic phosphorus thus confirming efficiency of complex topical effect of the given composition and vitamin D.

Keywords: chronic periodontitis, steroid osteoporosis, vitamin D3, immunotropic peptides, silicon glycerohydrogel

Введение

С развитием современных медицинских технологий все более актуальной становится разработка новых методов терапевтического лечения инфекционных заболеваний. Быстрое развитие антибиотикорезистентности оказывает свое, не менее важное, влияние на решение данной задачи [9]. Пародонтит – одна из острых проблем в стоматологии, что обусловлено склонностью данного заболевания к хронизации [1]. Процесс лечения требует не только высокой компетентности врача, но и ответственности пациента за соблюдение соответствующих рекомендаций. Поскольку пародонтит непосредственно проявляется убылью костной ткани альвеолярного отростка челюсти, терапевтическое лечение данного заболевания направлено на замедление или же приостановление развития атрофии кости, также возможна хирургическая коррекция дефекта кости. Наличие общесоматических патологий несомненно влияет на тяжесть течения заболевания, а также на результативность проводимого лечения [5].

Классические методы лечения пародонта могут быть малоэффективны в случае дефицита витамина D3 у пациентов [18]. Витамин D и его активные метаболиты являются компонентами гормональной регуляции фосфорно-кальциевого обмена и оказывают как гомеостатической

эффект на фосфорно-кальциевый обмен, так и способствуют минерализации кости. Это особенно важно, так как хронический пародонтит сопровождается резорбцией костной ткани. Ввиду этого, подход к диагностике и терапии хронического пародонтита должен быть комплексным, необходимо учитывать результаты лабораторного анализа крови на содержание Ca и витамина D3 и, в случае необходимости, включать в протоколы лечения препараты, восполняющие дефицит кальция и витамина D3.

Традиционно в профилактике и лечении заболеваний пародонта используются антибактериальные, противовоспалительные и другие препараты [3, 4, 10]. С ростом устойчивости патогенных микроорганизмов к подобным препаратам актуальной остается задача подбора новых высокоэффективных лекарственных композиций. На сегодняшний день синтетические пептиды активно используются для создания различных лекарственных форм [13, 17]. Например, синтетический пептид ZP2 активного центра гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора, обладающий иммунотропной активностью [6], в составе Ацеграм-спрея он успешно применялся в схеме лечения хронического генерализованного пародонтита [11, 12]. Для улучшения терапевтического действия основного действующего вещества возможно создание топической смеси с добавлением кремний-

органического глицерогидрогеля, обладающего транскутанной активностью [7, 14, 16].

Цель исследования – оценить терапевтический эффект нового метода лечения пародонтита, включающего пероральное введение витамина D3 и топическую иммуотропную композицию на основе антимикробного пептида ZP2.

Материалы и методы

На первом этапе создавали модель хронического пародонтита с сопутствующим стероидным остеопорозом у 14 лабораторных крыс линии Wistar – самки в возрасте 2-2,5 месяцев, средним весом 220-320 гр. Животные содержались на базе Института иммунологии и физиологии Уральского отделения Российской академии наук (ФГБУН ИИФ УрО РАН, г. Екатеринбург) в соответствии с требованиями ГОСТ Р от 02.12.2009 53434-2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики». Модель хронического пародонтита воссоздавалась согласно патенту РФ № 2545923, и представляла собой введение в периодонтальное пространство центрального нижнего резца цельнометаллической иглы длиной 12 мм под эфирным наркозом, с последующим извлечением на 26-й день [8, 15]. Кроме того, в рамках данной модели для снижения реактивности организма животных применяли преднизолон (4,8 мг, внутримышечно, ежедневно) – глюкокортикоид, угнетающий образование костной ткани, усиливающий ее резорбцию на фоне уменьшения концентрации кальция в крови, что вызывает в свою очередь вторичную гиперфункцию паращитовидных желез, одновременную стимуляцию остеокластов и ингибирование активности остеобластов. Известно, что препарат обладает иммуносупрессивным действием, в основе которого – угнетение пролиферации лимфоцитов (в первую очередь Т-лимфоцитов), подавление миграции В-лимфоцитов и кооперативного взаимодействия Т- и В-клеток. Преднизолон снижает количество высвобождаемых цитокинов (интерлейкинов 1 и 2, γ -интерферона), уменьшает продукцию антител [2].

На втором этапе, после извлечения иглы и прекращения инъекций преднизолона, все особи были разделены на 2 группы по 7 самок. Далее, каждый день в течение двух недель производилось лечение крыс. Группа I – путем аппликации на десну композиции состава: глицерогидрогель кремния, антимикробный пептид ZP2, гидроксиапатит; группа II – пероральное введение витамина D3 по одной капле в момент нанесения на десну композиции аналогичного (как для I группы крыс) состава.

На стадии заболевания и после завершения лечения, непосредственно перед выведением

особей из эксперимента, были проведены лабораторные исследования крови: общий анализ крови, кальций общий, щелочная фосфатаза и неорганический фосфор.

Статистический анализ проводился с использованием программы StatTech v. 3.1.6 (разработчик – ООО «Статтех», Россия). Количественные показатели оценивались на предмет соответствия нормальному распределению с помощью критерия Шапиро–Уилка (при числе исследуемых менее 50) или критерия Колмогорова–Смирнова (при числе исследуемых более 50). 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 двух групп по количественному показателю, имеющему нормальное распределение, при условии равенства дисперсий выполнялось с помощью t-критерия Стьюдента. Сравнение двух групп по количественному показателю, распределение которого отличалось от нормального, выполнялось с помощью U-критерия Манна–Уитни.

Результаты и обсуждение

Оценка терапевтической эффективности композиции производилась на основании клинических, лабораторных и гистологических данных.

Анализ клинических и лабораторных результатов проводился в несколько этапов. На 21-й день формирования модели пародонтита у крыс были отмечены: гиперемия слизистой оболочки в области введения иглы, ее отек, выделение гнойного экссудата и формирование подвижности зуба. Особое внимание заслуживает тот факт, что у 5 особей из разных групп сравнения отмечалось формирование абсцессов в поднижнечелюстной области, на основании чего можно судить об активности протекания заболевания и снижении иммунного статуса у данных особей. Также было произведено лабораторное исследование, включающее общий анализ крови и биохимический анализ крови на щелочную фосфатазу, кальций и фосфор (см. табл. 1).

По результатам анализов наблюдается снижение средних показателей лейкоцитов и лимфоцитов от значений интактных особей (табл. 1). Такие изменения связаны с катаболическим действием глюкокортикостероидов и, как следствие, с дистрофическими изменениями в лимфоидной ткани. Уменьшение лимфоцитов в периферической крови является результатом их перехода из кро-

ТАБЛИЦА 1. СРЕДНИЕ РЕЗУЛЬТАТЫ АНАЛИЗА КРОВИ КРЫС НА ЭТАПЕ МОДЕЛИРОВАНИЯ ЗАБОЛЕВАНИЯ

TABLE 1. AVERAGE RESULTS OF BLOOD ANALYSIS OF RATS AT THE STAGE OF DISEASE MODELING

Показатели Indicators	WBC ¹ , × 10 ⁹ /л WBC ¹ , × 10 ⁹ /L	LYM ² , %	NEUT ³ , %	HGB, %	PLT, × 10 ⁹ /л PLT, × 10 ⁹ /L
Интактные животные Intact animals	5,80±0,65	77±3	21±1	148,17±5,53	910,83±254,84
Животные с пародонтизом Animals with periodontitis	4,50 ±0,16	59±6	39±6	153,50±8,48	660,33±168,71
Показатели Indicators	Щелочная фосфатаза, ед/л Alkaline phosphatase, u/L		Кальций ⁴ , ммоль/л Calcium ⁴ , mmol/L		Фосфор неорганический ⁵ , ммоль/л Phosphorus inorganic ⁵ , mmol/L
Интактные животные Intact animals	89,83±16,49		2,53±0,10		1,65 ±0,13
Животные с пародонтизом Animals with periodontitis	138,67±54,49		3,05±0,45		7,70±0,71

Примечание. ¹ – различия статистически значимые, используемый метод: U-критерий Манна–Уитни, p = 0,025; ² – различия статистически значимые, используемый метод: t-критерий Стьюдента, p < 0,001; ³ – различия существенные, используемый метод: t-критерий Стьюдента, p < 0,001; ⁴ – различия статистически значимые, используемый метод: t-критерий Стьюдента, p = 0,021; ⁵ – различия существенные, используемый метод: U-критерий Манна–Уитни, p = 0,004.

Note. ¹, differences are statistically significant, the method used is Mann–Whitney U-test, p = 0.025; ², differences are statistically significant, the method used: Student's t-test, p < 0.001; ³, significant differences, the method used: Student's t-test, p < 0.001; ⁴, differences are statistically significant, the method used: Student's t-test, p = 0.021; ⁵, significant differences, the method used: Mann–Whitney U-test, p = 0.004.

ТАБЛИЦА 2. СРЕДНИЕ РЕЗУЛЬТАТЫ АНАЛИЗА КРОВИ КРЫС I ГРУППЫ (ЛЕЧЕНИЕ: АППЛИКАЦИЯ НА ДЕСНУ) И II ГРУППЫ (ЛЕЧЕНИЕ: АППЛИКАЦИЯ НА ДЕСНУ + ВИТ. D3 ПЕРОРАЛЬНО) СРАВНЕНИЯ ПОСЛЕ ЛЕЧЕНИЯ

TABLE 2. MEAN BLOOD TEST RESULTS OF GROUP I (TREATMENT: GUM APPLICATION) AND GROUP II (TREATMENT: GUM APPLICATION + VITAMIN D3 ORAL) COMPARISON AFTER TREATMENT

Общий анализ крови ¹ Complete blood count ¹					
Показатели Indicators	WBC, × 10 ⁹ /л WBC, × 10 ⁹ /L	LYM, %	NEUT, %	HGB, %	PLT, × 10 ⁹ /л PLT × 10 ⁹ /L
Группа I Group I	5,0±1,7	65±11	33±12	42±5	820,00±96,75
Группа II Group II	5,0±1,5	56±4	39±5	43±1	738,00±82,75
Биохимический анализ крови Blood chemistry					
Показатели Indicators	Щелочная фосфатаза ³ , ед/л Alkaline phosphatase ³ , u/L	Кальций ³ , ммоль/л Calcium ³ , mmol/L		Фосфор неорганический ² , ммоль/л Phosphorus inorganic ² , mmol/L	
Группа I Group I	141,33±48,00	3,07±0,35		5,50±0,17	
Группа II Group II	121,83±16,24	2,75±0,19		1,55±0,25	

Примечание. ¹ – различия статистически значимые, используемый метод: t-критерий Уэлча, p = 0,338; ² – различия существенные, используемый метод: U-критерий Манна–Уитни, p = 0,004; ³ – различия статистически значимые, p < 0,5.

Note. ¹, differences are statistically significant, the method used: Welch's t-test, p = 0.338; ², significant differences, the method used: Mann–Whitney U-test, p = 0.004; ³, differences are statistically significant, p < 0.5.

ви в лимфоидную ткань и накопления в костном мозге. Кроме того, после курса инъекций преднизолона наблюдается достоверное повышение уровня нейтрофилов (табл. 1), которое можно связать с возможными протекающими воспалительными процессами в организме животных. Повышенное содержание щелочной фосфатазы и изменение количественного соотношения Са/Р в сторону увеличения фосфора (табл. 1) свидетельствует об активном выведении кальция из организма и подавлении процессов остеогенеза у экспериментальных животных с пародонтитом.

После получения подтверждения развития модели хронического пародонтита, было начато лечение каждой группы крыс. В группе 1 лечение проводилось путем аппликации композиций в зону воспалительного очага в течение двух недель. В группе 2 аппликация композиции сопровождалась пероральным введением витамина D₃. В обеих экспериментальных группах крыс было отмечено улучшение клинических показателей (отсутствие кровоточивости, гиперемии маргинального края десны, а также отсутствие подвижности зубов и гноетечения). Согласно лабораторным данным, в группе, лечение которой сопровождалось введением витамина D₃, отмечены различия в следующих показателях крови по сравнению с I группой: достоверное снижение количества щелочной фосфатазы и неорганического фосфора (табл. 2).

Положительный эффект лечения II группы крыс обусловлен тем, что активная форма витамина Д – 1,25(OH)₂D является основными регуляторами обмена кальция в организме наряду

с паратиреоидным гормоном (ПТГ) и кальцитонином, при этом витамин Д оказывает на обмен кальция активирующее действие.

Гистологическое исследование костной ткани крыс I и II группы после лечения представлено на рисунках 1 и 2 (см. 2-ю стр. обложки). На фрагментах нижней челюсти животных, прослеживается положительная динамика восстановления костной ткани. Это проявляется в отсутствии остеокластов, уменьшении лакун, уплотнении и нормализации структуры ткани. Кроме того, наблюдается восстановление микроциркуляторного русла, формирование сосудов и грануляционной ткани.

Заключение

По результатам клинических, лабораторных и гистологических исследований было установлено, что во всех группах сравнения экспериментальных животных отмечался хороший терапевтический эффект в ходе лечения пародонтита с применением иммуотропной топической композиции на десну. Сочетание пептида, который обладает широким спектром действия, и кремнийорганического глицерогидрогеля, обладающего транскутанной активностью, оказывает хорошее воздействие на этиологический фактор заболевания. Однако в группе, лечение которой было дополнено пероральным введением витамина D₃, биохимические показатели, описывающие фосфорно-кальциевое соотношение, были несколько лучше. Все это можно объяснить комплексным действием применяемой топической композиции и витамина.

Список литературы / References

1. Большедворская Н.Е., Казанкова Е.М. Этиопатогенетические особенности воспалительных заболеваний пародонта // Безопасность здоровья человека, 2017. №. 3. С. 26-35. [Bolshedvorskaya N.E., Kazankova E.M. Etiopathogenetic features of periodontal inflammatory diseases. *Bezopasnost zdorovya cheloveka = Security of Human Health*, 2017, no. 3, pp. 26-35. (In Russ.)]
2. Борисова Е.О. Клиническая фармакология парентеральных форм глюкокортикостероидов // Лечебное дело, 2007. №. 3. С. 17-24. [Borisova E.O. Clinical pharmacology of parenteral forms of glucocorticosteroids. *Lechebnoe delo = Medicine*, 2007, no. 3, pp. 17-24. (In Russ.)]
3. Гилева О.С., Бондаренко Е.А., Гибадуллина Н.В., Садилова В.А., Гилева Е.С., Позднякова А.А., Сатюкова Л.Я. Новые подходы к лечению воспалительных заболеваний пародонта // Уральский медицинский журнал, 2011. № 5 (83). С. 22-27. [Gileva O.S., Bondarenko E.A., Gibadullina N.V., Sadiлова V.A., Gileva E.S., Pozdnyakova A.A., Satukova L.Y. New approaches to the treatment of inflammatory periodontal diseases. *Uralskiy meditsinskiy zurnal = Ural Medical Journal*, 2011, no. 5 (83), pp. 22-27. (In Russ.)]
4. Горбунова И.Л., Ивашкеева И.П., Ефименко К.А., Колобова Д.О., Баранник А.А., Деревянко А.С. Обоснование эффективности местной антибактериальной терапии в комплексном лечении больных хроническим генерализованным пародонтитом // Уральский медицинский журнал, 2018. № 1 (156). С. 34-38. [Gorbunova I.L., Ivashkeeva I.P., Efimenko K.A., Kolobova D.O., Barannik A.A., Derevyanko A.S. The local antibiotic therapy efficiency ground for the complex treatment of patients suffering from chronic generalized periodontitis. *Uralskiy meditsinskiy zurnal = Ural Medical Journal*. 2018, no. 1 (156), pp. 34-38. (In Russ.)]

5. Дурягина Л.Х., Колесник В.М., Дегтярева Л.А., Седых В.П., Андрианова И.И., Прийма Н.В., Саенко Т.С., Дубровина-Парус Т.А., Вахтина Е.Б., Дорофеева О.В. Некоторые аспекты течения заболеваний пародонта и слизистой оболочки полости рта при сочетании с соматической патологией: обзор литературы // Крымский терапевтический журнал, 2020. № 1. С. 43-48. [Duryagina L.Kh., Kolesnik V.M., Degtyareva L.A., Sedykh V.P., Andrianova I.I., Priima N.V., Saenko T.S., Dubrovina-Parus T.A., Vakhtina E.B., Dorofeeva O.V. Some aspects of the course of periodontal diseases and diseases of mucous membrane of an oral cavity in combination with somatic pathology: a literature review. *Krymskiy terapevticheskiy zhurnal = Crimean Therapeutic Journal*, 2020, no. 1, pp. 43-48. (In Russ.)]

6. Зурочка А.В., Зурочка В.А., Добрынина М.А., Зуева Е.Б., Дукарт В.В., Гриценко В.А., Тяпаева Я.В., Черешнев В.А. Феномен наличия уникальной комбинации иммунобиологических свойств у синтетического аналога активного центра гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ) // Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН, 2016. № 2. 9 с. [Zurochka A.V., Zurochka V.A., Dobrynina M.A., Zueva E.B., Duckart V.V., Gritsenko V.A., Tyapaeva Y.V., Chereshev V.A. The phenomenon of unique combination of immunobiological properties of synthetic analogue of the active center of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF). *Bulleten Orenburgskogo nauchnogo tsentra UrO RAN = Bulletin of the Orenburg Scientific Center of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences*, 2016, no. 2, 9 p. (In Russ.)]

7. Овсепян Н.А., Тузанкина И.А., Саркисян Н.Г., Долгих М.А., Соколова К.В. Применение терапевтической композиции топического применения, содержащей препараты Ацеграм и силативит гель, на модели хронического пародонтита у крыс // Российский иммунологический журнал, 2017. Т. 11, № 3 (20). С. 448-450. [Ovsyeryan N.A., Tuzankina I.A., Sarkisyan N.G., Dolgih M.A., Sokolova K.V. Application of therapeutic composition of topical application containing Acegram and silatitvit-gel on the model of chronic periodontitis in rats. *Rossiyskiy immunologicheskii zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2017, Vol. 11, no. 3 (20), pp. 448-450. (In Russ.)]

8. Патент на изобретение № 2470640 РФ. Средство для лечения воспалительных заболеваний полости рта и способ лечения воспалительных заболеваний полости рта / О.Н. Чупахин, А.С. Симбирцев, Т.Г. Хонина, Н.Г. Саркисян и др.; опубл. 27.12.2012. // Бюллетень 2012. № 36. 16 с. [The patent for the invention № 2470640 of the Russian Federation. Agent for treating inflammatory oral diseases and method of treating inflammatory oral diseases / O.N. Chupakhin, A.S. Simbirtsev, T.G. Honina, N.G. Sarkisyan et al.; publ. 12/27/2012. // Bull. 2012. № 36. 16 p.]

9. Пушилина А.Д., Коменкова Т.С., Зайцева Е.А. Современные представления о механизмах формирования резистентности микроорганизмов к антимикробным препаратам // Медико-фармацевтический журнал «Пульс», 2019. Т. 21, № 10. С. 125-130. [Pushilina A.D., Komenkova T.S., Zaitseva E.A. Microorganisms antibiotic resistance mechanisms – present view. *Mediko-pharmatsepticheskiy zurnal «Puls» = Medical and Pharmaceutical Journal «Pulse»*, 2019, Vol. 21, no. 10, pp. 125-130. (In Russ.)]

10. Самигуллина Л.И., Таминдарова Р.Р., Кавеева А.А. Клинико-рентгенологическая оценка эффективности применения нимесулида в комплексном лечении хронического генерализованного пародонтита в стадии обострения // Уральский медицинский журнал, 2016. № 8 (141). С. 110-113. [Samigullina L.I., Tamindarova R.R., Kaveeva A.A. Clinical and radiological evaluation of efficiency of nimesulide in patients with exacerbation of chronic periodontitis. *Uralskiy meditsinskiy zurnal = Ural Medical Journal*, 2016, no. 8 (141), pp. 110-113. (In Russ.)]. doi: 10.31857/S102872210006952-2.

11. Саркисян Н.Г., Катаева Н.Н., Тузанкина И.А., Меликян С.Г. Антимикробные пептиды в терапии слизистой полости рта // Российский иммунологический журнал, 2019. Т. 13, № 2-1 (22). С. 524-526. [Sarkisyan N.G., Kataev N.N., Tuzankina I.A., Melikyan S.G. Antimicrobial peptides in the treatment of muscular oral cavity. *Rossiyskiy immunologicheskii zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2019, Vol. 13, no. 2-1 (22), pp. 524-526. (In Russ.)]

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

13. Саркисян Н.Г., Катаева Н.Н., Хохрякова Д.А., Меликян С.Г. Применение синтетических пептидов в профилактике заболеваний полости рта // Врач, 2023. Т. 34, № 2. С. 62-65. [Sarkisyan N.G., Kataev N.N., Khokhryakova D.A., Melikyan S.G. Use the synthetic peptides in the prevention of oral diseases. *Vrach = Doctor*, 2023, Vol. 34, no. 2, pp. 62-65. (In Russ.)]

14. Саркисян Н.Г., Ронь Г.И., Тузанкина И.А., Хонина Т.Г., Ларионов Л.П., Симбирцев А.С., Дроздова Л.И., Тимченко А.С. Морфологическая оценка эффективности использования фармакологиче-

ских композиций на основе кремнийорганического глицерогидрогеля // Иммунология, 2017. Т. 38, № 2. С. 91-96. [Sarkisyan N.G., Ron G.I., Tuzankina I.A., Honina T.G., Larionov L.P., Simbirtsev A.S., Drozdova L.I., Timchenko A.S. Morphological evaluation of the effectiveness of the use of pharmacological compositions based on silicone glycerohydrogel. *Immunologiya = Immunology*, 2017, Vol. 38, no. 2, pp. 91-96. (In Russ.)]

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

16. Саркисян Н.Г., Чумаков Н.С., Гренадерова М.А. Экспериментальная оценка эффективности пептидсодержащего препарата в лечении хронического пародонтита. Российский иммунологический журнал, 2019. Т. 13, № 3 (22). С. 1258-1262. [Sarkisyan N.G., Chumakov N.S., Grenaderova M.A. Experimental evaluation of the efficiency of the peptidecontaining drug in the treatment of chronic periodontitis. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2019, Vol. 13, no. 3 (22), pp. 1258-1262. (In Russ.)]. doi: 10.31857/S102872210007265-6.

17. Хлыстова К.А., Саркисян Н.Г., Катаева Н.Н. Природные и синтетические пептиды в антимикробной терапии // Российский иммунологический журнал, 2023. Т. 26, № 2. С. 105-114. [Khlystova K.A., Sarkisyan N.G., Kataeva N.N. Natural and synthetic peptides in antimicrobial therapy. *Rossiyskiy Immunologicheskiy Zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2023, Vol. 26, no. 2, pp. 105-114. (In Russ.)]. doi: 10.46235/1028-7221-12362-NAS.

18. Wang C.-W.J., McCauley L.K. Osteoporosis and periodontitis. *Curr. Osteoporos. Rep.*, 2016, Vol. 14, no. 6, pp. 284-291.

Авторы:

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

Чумаков Н.С. — аспирант ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук, г. Екатеринбург, Россия

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

Authors:

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

Chumakov N.S., Postgraduate Student, Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Yekaterinburg, Russian Federation

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

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

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

Дроздова Л.И. — д.вет.н., профессор, заведующая кафедрой морфологии и экспертизы ФГБОУ ВО «Уральский государственный аграрный университет», г. Екатеринбург, Россия

Drozdova L.I., PhD, MD (Veterinary Sciences), Professor, Head, Department of Morphology and Expertise, Ural State Agrarian University, Yekaterinburg, Russian Federation

Тузанкина И.А. — д.м.н., профессор, заслуженный деятель науки РФ, главный научный сотрудник ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук, г. Екатеринбург, Россия

Tuzankina I.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Honored Worker of Science, Chief Research Associate, Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Yekaterinburg, Russian Federation

Поступила 07.07.2023
Принята к печати 12.07.2023

Received 07.07.2023
Accepted 12.07.2023

sIgA-ПРОТЕАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ МИКРООРГАНИЗМОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ СЕКРЕТА ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

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

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

Резюме. Цель – охарактеризовать способность бактерий разной таксономической принадлежности, выделенных из секрета простаты, инактивировать секреторный IgA (sIgA).

Эксперименты проводили на 122 изолятах восьми видов микроорганизмов, выделенных из секрета простаты больных хроническим бактериальным простатитом (ХБП) и здоровых мужчин. Бактериальный спектр микрофлоры исследовали бактериологическим методом, видовую идентификацию микроорганизмов осуществляли методом масс-спектрометрии. sIgA-протеазную активность микроорганизмов определяли иммуноферментным методом с использованием набора «IgA секреторный – ИФА-БЕСТ».

Установлена широкая распространенность sIgA-протеазной активности у микроорганизмов разных видов, выделенных из секрета предстательной железы больных ХБП и здоровых мужчин. Наиболее активными продуцентами sIgA-протеаз явились *E. faecalis*. Выявлена внутривидовая и межвидовая вариабельность уровня sIgA-протеазной активности среди стафилококков. Установлено, что микроорганизмы, выделенные при ХБП, обладают достоверно более выраженной способностью к инактивации sIgA по сравнению со штаммами, изолированными от здоровых мужчин.

Ключевые слова: хронический бактериальный простатит, секрет предстательной железы, бактерии, бактериальная персистенция, sIgA-протеазная активность, антииммуноглобулиновая активность

sIgA-PROTEASE ACTIVITY OF MICROORGANISMS ISOLATED FROM THE PROSTATE SECRETION

Pashinina O.A., Kartashova O.L., 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. Our aim was to characterize the ability of bacteria from prostate secretions of different taxonomic affiliations to inactivate secretory IgA (sIgA). Materials and methods: We performed experiments with 122

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: olga25mikro@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: olga25mikro@mail.ru

Образец цитирования:

О.А. Пашина, О.Л. Карташова, Т.М. Пашкова, В.А. Гриценко «sIgA-протеазная активность микроорганизмов, выделенных из секрета предстательной железы» // Российский иммунологический журнал, 2023. Т. 26, № 4. С. 471-476. doi: 10.46235/1028-7221-13776-SPA

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

For citation:

O.A. Pashinina, O.L. Kartashova, T.M. Pashkova, V.A. Gritsenko "sIgA-protease activity of microorganisms isolated from the prostate secretion", Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2023, Vol. 26, no. 4, pp. 471-476. doi: 10.46235/1028-7221-13776-SPA

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

DOI: 10.46235/1028-7221-13776-SPA

isolates of eight types of microorganisms isolated from prostate secretions of the patients with chronic bacterial prostatitis (CBP) and healthy males. The bacterial spectrum of microbiota was studied by bacteriological techniques, the species identification of microorganisms was carried out by mass spectrometry. The sIgA-protease activity of microorganisms was determined by the enzyme immunoassay using the "IgA secretory – ELISA-BEST" kit. Results: A wide prevalence of sIgA-protease activity has been detected in the microorganisms of different types isolated from prostate secretions of patients with CBP and healthy males. *E. faecalis* was the most active producer of sIgA proteases. We revealed an intraspecific and interspecific variability of the levels of sIgA-protease activity among Staphylococci. The microorganisms isolated from CBP were shown to express a significantly more pronounced ability to inactivate sIgA compared to strains isolated from healthy men.

Keywords: chronic bacterial prostatitis, prostate secretion, bacteria, bacterial persistence, sIgA protease activity, anti-immunoglobulin activity

Введение

Условно-патогенные бактерии, стремясь выжить в условиях биотопа, реализуют свои персистентные свойства, благодаря которым приобретают способность противостоять факторам естественной резистентности макроорганизма [3]. sIgA-протеазная активность – один из факторов персистенции, обеспечивающих толерантность микроорганизмов к действию секреторного иммуноглобулина IgA.

Секреторный иммуноглобулин А обладает выраженным протективным эффектом в отношении микроорганизмов и противостоит микробной колонизации биотопов макроорганизма. Несмотря на то, что секреторный компонент предохраняет sIgA от разрушения микробными протеазами, многие микроорганизмы способны его деградировать, супрессируя, тем самым, локальный иммунитет.

У микроорганизмов, выделенных из секрета простаты при ХБП, изучен широкий спектр факторов патогенности и персистенции [6, 7], однако данные о способности этих микроорганизмов инактивировать секреторный IgA малочисленны и противоречивы.

Цель исследования – охарактеризовать способность бактерий разной таксономической принадлежности, выделенных из секрета простаты, инактивировать секреторный IgA.

Материалы и методы

В работе были исследованы 122 штамма восьми видов микроорганизмов (*E. coli* (16 шт.), *K. pneumoniae* (4 шт.), *M. morgani* (4 шт.), *S. aureus* (16 шт.), *S. haemolyticus* (34 шт.), *S. epidermidis* (20 шт.), *S. warneri* (6 шт.), *E. faecalis* (22 шт.)), выделенных из секрета простаты мужчин больных хроническим бактериальным простатитом (ХБП) и здоровых мужчин. Видовую принадлежность микроорганизмов оценивали с помощью масс-спектрометра MALDI-TOF серии Microflex (Bruker Daltonics, Германия).

sIgA-протеазную активность микроорганизмов определяли иммуноферментным методом по [4] с использованием набора «IgA секреторный – ИФА-БЕСТ». Оптическую плотность опытной и контрольной проб измеряли на фотометре STAT FAX 2100 при λ 492 нм. sIgA-протеазную активность рассчитывали как отношение разности концентрации иммуноглобулина А в контроле и опыте к контрольной концентрации иммуноглобулина А и выражали в процентах.

Статистический анализ результатов проводился с помощью пакета программ Microsoft Excel 2007. 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

При бактериологическом исследовании секрета простаты стафилококки разных видов выделяли в 62,3% случаев, *E. faecalis* – в 18% случаев, а *E. coli* и другие энтеробактерии – в 19,7%. При ХБП были идентифицированы микроорганизмы восьми видов – *E. coli*, *K. pneumoniae*, *M. morgani*, *S. aureus*, *S. haemolyticus*, *S. epidermidis*, *S. warneri*, *E. faecalis*, а из секрета простаты здоровых мужчин – 6 видов, *M. morgani* и *S. warneri* выделены не были.

Анализ частоты встречаемости sIgA-протеазной активности у изученных штаммов бактерий показал широкое распространение данного признака среди выделенных микроорганизмов. Так, абсолютно все выделенные штаммы энтеробактерий и энтерококков характеризовались способностью инактивировать sIgA. Среди стафилококков данный маркер персистенции был выявлен у всех изолятов *S. haemolyticus*, 66,7% – *S. warneri*, 70% – *S. epidermidis* и только у 25% штаммов *S. aureus*.

Максимальный уровень sIgA-протеазной активности был выявлен у изолятов *E. faecalis* ($22,1 \pm 0,4\%$), а минимальный – у *S. aureus*

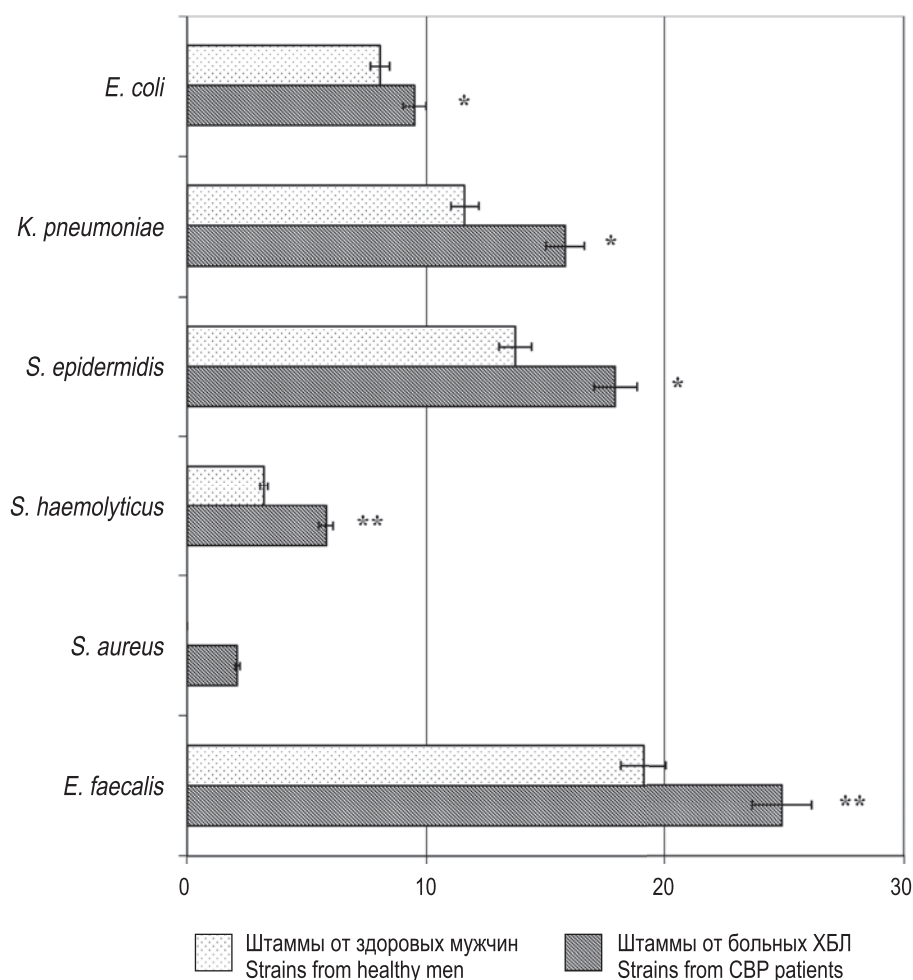


Рисунок 1. Уровни sIgA-протеазной активности микроорганизмов, выделенных из секрета простаты у больных ХБП и здоровых мужчин

Примечание. * – $p < 0,01$; ** – $p < 0,001$.

Figure 1. sIgA-protease activity of microorganisms isolated from prostate secretions in CBP and from healthy men

Note. *, $p < 0.01$; **, $p < 0.001$.

($2,1 \pm 0,1\%$). У энтеробактерий выраженность данного признака колебалась в диапазоне от $8,7 \pm 0,2\%$ у *E. coli* до $13,7 \pm 0,1\%$ у *K. pneumoniae*. У коагулазоотрицательных стафилококков уровень sIgA-протеазной активности уменьшался в ряду: *S. epidermidis* ($15,8 \pm 0,1\%$) *S. warneri* ($8,4 \pm 0,2\%$) *S. haemolyticus* ($4,5 \pm 0,2\%$).

Сравнительный анализ частоты встречаемости и уровня выраженности sIgA-протеазной активности штаммов, выделенных от больных хроническим бактериальным простатитом и здоровых мужчин, показал, что экспрессивность исследуемого свойства была существенно ($p < 0,01$) выше у штаммов, выделенных при патологии.

У изолятов *E. coli* и *K. pneumoniae*, выделенных при патологии, выраженность sIgA-протеазной активности была выше на 16 и 27% и составила $9,5 \pm 0,3\%$ и $15,8 \pm 0,2\%$ против $8,0 \pm 0,1\%$ и $11,6 \pm 0,1\%$ соответственно. Среди грамположи-

тельных кокков разница экспрессии признака была отмечена от 23% у *S. epidermidis* до 45% у штаммов *S. haemolyticus*. При этом выраженность sIgA-протеазной активности штаммов, выделенных при ХБП, составила у *E. faecalis* – $24,9 \pm 0,3\%$, у *S. epidermidis* – $17,9 \pm 0,4\%$, у *S. haemolyticus* – $5,8 \pm 0,15\%$ и у *S. aureus* – $2,1 \pm 0,05\%$; у изолятов от здоровых мужчин – *E. faecalis* – $19,1 \pm 0,5\%$, у *S. epidermidis* – $13,7 \pm 0,1\%$, у *S. haemolyticus* – $3,2 \pm 0,2\%$, а штаммы *S. aureus* не проявляли способности к инактивации секреторного иммуноглобулина А (рис. 1).

Заключение

Известно, что многие патогенные и потенциально патогенные бактерии могут проявлять антииммуноглобулиновую активность, то есть инактивировать иммуноглобулины (антитела), что позволяет им выживать в макроорганизме

при контакте с этими гуморальными эффекторами иммунитета [3]. Один из механизмов антииммуноглобулиной активности бактерий связан с их способностью секретировать во внешнюю среду специфические протеолитические ферменты – sIgA-протеазы, расщепляющие аминокислотную цепь $\alpha 1$ у IgA1 в области дупликации.

В нашем исследовании установлена относительно широкая распространенность sIgA-протеазной активности у микроорганизмов разных видов, выделенных из секрета предстательной железы у больных ХБП и здоровых мужчин. К наиболее активным продуцентам sIgA-протеаз следует отнести штаммы *E. faecalis*, все проявлявшие данный признак, причем с самой высокой его экспрессией. Все выделенные клинические изоляты энтеробактерий также обладали sIgA-протеазной активностью, но ее уровень был в 1,6-2,5 раза ниже, чем у энтерококков. Максимальную степень внутриродовой (межвидовой) вариабельности по частоте встречаемости и уровню выраженности sIgA-протеазной активности демонстрировали штаммы стафилококков. При этом продуцентами sIgA-протеаз являлись все изоляты *S. haemolyticus* и только 25% штаммов *S. aureus*, у которых, кроме того, наблюдался самый низкий уровень выраженности данного признака. Полученные результаты, с одной стороны, указывают на наличие у микроорганизмов, персистирующих в предстательной железе у больных ХБП, механизмов защиты от такого эффектора гуморального иммунитета, как sIgA, с другой стороны, объясняют снижение уровня sIgA в секрете простаты, которое регистрируется у пациентов с указанной патологией [5].

Не менее интересны результаты, указывающие на то, что бактерии, выделенные при ХБП, обладают достоверно более выраженной способностью к инактивации секреторного иммуноглобулина А по сравнению со штаммами микроорганизмов той же видовой принадлежности, изолированными от здоровых мужчин. Выявленные нами значимые различия в экспрессии sIgA-протеазной активности у штаммов бактерий, выделенных от больных хроническим

бактериальным простатитом и здоровых мужчин, согласуются с результатами ранее проведенных исследований. Так, коллективом авторов с использованием метода радиальной иммунодиффузии в геле показано, что у стафилококков, выделенных из эякулята у больных с ХБП, антииммуноглобулиновая активность была существенно выше, чем у штаммов, изолированных из спермы здоровых мужчин [2].

Безусловно, следует согласиться с мнением авторов, считающих, что показатели местного иммунитета, в том числе концентрация sIgA в эякуляте и/или секрете простаты, могут служить информативными критериями для диагностики хронического простатита [1]. Однако в этом случае необходимо учитывать, что при бактериальном варианте данной патологии на уровень иммуноглобулинов в указанных биосредах могут существенное влияние оказывать метаболические особенности вегетирующих в урогенитальном тракте микроорганизмов, в частности наличие у них способности продуцировать и секретировать во внеклеточное пространство sIgA-протеазы.

Очевидно, высокий уровень экспрессии sIgA-протеазной активности у персистирующих штаммов бактерий, выделенных при ХБП, необходим для их выживания в условиях действия секреторного иммуноглобулина А. В то же время продукция бактериями метаболитов, инактивирующих факторы противoinфекционной резистентности, может приводить к развитию местного иммунодефицита с последующим формированием хронического воспалительного процесса в предстательной железе, что влечет за собой морфофункциональные дегенеративные изменения в ткани данного органа.

В этом смысле дальнейшее изучение у больных ХБП иммуностатуса предстательной железы и персистентного потенциала бактерий, колонизирующих простату, позволит разработать новые иммунологические и микробиологические маркеры данной патологии, которые могут быть использованы как при ее диагностике, так и для оценки эффективности ее лечения.

Список литературы / References

1. Бобков Ю.А., Аль-Шукри С.Х., Горбачев А.Г., Галкина О.В., Козлов В.В., Тотолян А.А. Информативность показателей местного иммунитета при хроническом простатите // Медицинская иммунология, 2000. Т. 2, № 4. С. 401-408. [Bobkov Yu.A., Al-Shukri S.H., Gorbachev A.G., Galkina O.V., Kozlov V.V., Totolian A.A. Informativeness of indicators of local immunity in chronic prostatitis. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2000, Vol. 2, no. 4, pp. 401-408. (In Russ.)]
2. Бойко О.В., Терентьев А.А., Ахминеева А.Х. Метаболическая активность микроорганизмов, выделенных у больных хроническим простатитом // Проблемы репродукции, 2014. № 6. С. 6-9. [Boyko O.V., Terentyev A.A., Ahmineeva A.H. Metabolic activity of microorganisms isolated from patients with chronic prostatitis. *Problemy reproduksii = Problems of Reproduction*, 2014, no. 6, pp. 6-9. (In Russ.)]

3. Бухарин О.В. Персистенция патогенных бактерий. М.: Медицина, 1999. 365 с. [Bukharin O.V. Persistence of pathogenic bacteria]. Moscow: Meditsina, 1999. 365 p.
4. Бухарин О.В., Чайникова И.Н., Вальшев А.В. Способ определения антииммуноглобулиновой активности микроорганизмов // Патент РФ № 2236465. Бюл. № 26 от 20.09.2004. [Bukharin O.V., Chaunikova I.N., Valyshev A.V. Method for determining the anti-immunoglobulin activity of microorganisms // RF Patent No. 2236465. Bull. No. 26 09.20.2004].
5. Камалов А.А., Ефремов Е.А., Дорофеев С.Д., Охоботов Д.А., Мельник Я.И., Бедретдинова Д.А. Клинико-иммунологические аспекты хронического бактериального простатита на фоне проведения иммуномодулирующей терапии // Эффективная фармакотерапия. Урология и нефрология, 2007. № 3. С. 10-17. [Kamalov A.A., Efremov E.A., Dorofeev S.D., Ohobotov D.A., Melnik Ya.I., Bedretdinova D.A. Clinical and immunological aspects of chronic bacterial prostatitis against the background of immunomodulatory therapy. *Effektivnaya farmakoterapiya. Urologiya i nefrologiya = Effective Pharmacotherapy. Urology and Nephrology*, 2007, no. 3, pp. 10-17. (In Russ.)]
6. Карташова О.Л., Пашина О.А., Пашкова Т.М., Гриценко В.А., Михайленко С.В. Биопрофили стафилококков разных видов, выделенных из секрета предстательной железы у мужчин с хроническим бактериальным простатитом // Тихоокеанский медицинский журнал, 2023. № 1. С. 70-74. [Kartashova O.L., Pashinina O.A., Pashkova T.M., Gricenko V.A., Mihajlenko S.V. Bioprofiles of various types of staphylococci isolated from prostate secretions in men with chronic bacterial prostatitis. *Tikhookeanskiy meditsinskiy zhurnal = Pacific Medical Journal*, 2023, no. 1, pp. 70-74. (In Russ.)]
7. 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 уrogenитальной инфекции // Российский иммунологический журнал, 2021. Т. 24, № 2. С. 257-260. [Kartashova O.L., Pashkova T.M., Pashinina O.A., Morozova N.V. Anticytokine activity and ability to produce cytokine-like substances of staphylococci isolated from prostate secretion in men with symptoms of urogenital infection. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2021, Vol. 24, no. 2, pp. 257-260. (In Russ.)]. doi: 10.46235/1028-7221-995-AAA.

Авторы:

Пашина О.А. — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории персистенции и симбиоза микроорганизмов Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза Уральского отделения Российской академии наук — структурное подразделение ФГБУН «Оренбургский федеральный исследовательский центр» Уральского отделения Российской академии наук, г. Оренбург, Россия

Карташова О.Л. — д.б.н., доцент, ведущий научный сотрудник лаборатории персистенции и симбиоза микроорганизмов Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза Уральского отделения Российской академии наук — структурное подразделение ФГБУН «Оренбургский федеральный исследовательский центр» Уральского отделения Российской академии наук, г. Оренбург, Россия

Authors:

Pashinina O.A., PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Microbial Persistence and Symbiosis, 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 Research Associate, 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

Пашкова Т.М. — д.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории персистенции и симбиоза микроорганизмов Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза Уральского отделения Российской академии наук — структурное подразделение ФГБУН «Оренбургский федеральный исследовательский центр» Уральского отделения Российской академии наук, г. Оренбург, Россия

Pashkova T.M., PhD, MD (Biology), Leading Research Associate, 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

Гриценко В.А. — д.м.н., профессор, главный научный сотрудник, Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза Уральского отделения Российской академии наук — структурное подразделение ФГБУН «Оренбургский федеральный исследовательский центр» Уральского отделения Российской академии наук, г. Оренбург, Россия

Gritsenko V.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Chief Research Associate, Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, Orenburg Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Orenburg, Russian Federation

Поступила 09.07.2023
Принята к печати 12.07.2023

Received 09.07.2023
Accepted 12.07.2023

ОТЛИЧИЯ В СПЕКТРЕ МИКРОБИОТЫ КОЖИ И ПАРАМЕТРАХ ЛОКАЛЬНОГО ИММУНИТЕТА В ОЧАГЕ ВОСПАЛЕНИЯ У ДЕРМАТОЛОГИЧЕСКИХ БОЛЬНЫХ ОТ ЗДОРОВЫХ ЛЮДЕЙ

Сенникова С.В.¹, Топтыгина А.П.^{1,2}, Воропаева Е.А.^{1,3}

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 ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Резюме. Нарушение состава нормальной микробиоты является триггерным, а иногда и этиологическим фактором развития хронических заболеваний кожи, таких как псориаз или экзема. Распознавание микрофлоры кератиноцитами и иммунокомпетентными клетками приводит к продукции антимикробных пептидов, хемокинов и ростовых факторов, что способствует дифференцировке Т-лимфоцитов в аутоагрессивные эффекторы Th1-, Th17- и Th22-типов, реализующие аутоиммунное воспаление в псориатической бляшке. Целью работы было исследование различий в спектре микробиоты кожи и параметров локального иммунитета в капиллярной крови, взятой рядом с очагом воспаления у больных с аутоиммунным (псориаз) и аллергическим (экзема) заболеванием по сравнению с параметрами здоровых людей. Обследованы 24 больных псориазом (группа 1), 20 больных экземой (группа 2) и 20 здоровых взрослых (группа 3). Взятие биологического материала (мазок стерильным сухим тампоном в транспортную систему Amies с активированным углем и взятие капиллярной крови в 2 микроветы по 200 мкл) проводили из очагов воспаления на коже кистей рук у пациентов или из пальца кистей рук у здоровых. Выполняли посевы на диагностические среды, микроскопию с окраской по Граму и идентификацию на микробиологическом анализаторе. Иммунофенотипирование 22 субпопуляций мононуклеаров проводили путем четырехцветного окрашивания цельной капиллярной крови с лизированием эритроцитов и оценкой субпопуляций на проточном цитометре. Цитокины в плазме крови определяли мультиплексным методом. Спектр микрофлоры кожи рук группы 3 был более разнообразным по видовому составу. У пациентов с псориазом и экземой доминировала

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:

С.В. Сенникова, А.П. Топтыгина, Е.А. Воропаева
«Отличия в спектре микробиоты кожи и параметрах локального иммунитета в очаге воспаления у дерматологических больных от здоровых людей» // Российский иммунологический журнал, 2023. Т. 26, № 4. С. 477-484.
doi: 10.46235/1028-7221-13086-DIT
© Сенникова С.В. и соавт., 2023
Эта статья распространяется по лицензии Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

S.V. Sennikova, A.P. Toptygina, E.A. Voropaeva "Differences in the skin microbiota spectrum and parameters of local immunity in the areas of inflammation in skin diseases and healthy people", Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2023, Vol. 26, no. 4, pp. 477-484.
doi: 10.46235/1028-7221-13086-DIT
© Sennikova S.V. et al., 2023
The article can be used under the Creative Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.46235/1028-7221-13086-DIT

кокковая флора, со сдвигом спектра микробиоты в сторону условно патогенных микроорганизмов. Обнаружена активация Т- и В-клеток, продукция провоспалительных цитокинов, цитокинов оси IL-23/IL-17/IL-22 и цитокинов – маркеров повреждения клеток эпителия (IL-25 и IL-33), а также недостаточность противовоспалительных факторов. Выявлены различия в изменениях параметров локального иммунного статуса у больных с аутоиммунным (псориаз) и аллергическим (экзема) заболеваниями, отражающие особенности иммунопатогенеза этих заболеваний.

Ключевые слова: псориаз, экзема, субпопуляции лимфоцитов, цитокины, капиллярная кровь, микробиота

DIFFERENCES IN THE SKIN MICROBIOTA SPECTRUM AND PARAMETERS OF LOCAL IMMUNITY IN THE AREAS OF INFLAMMATION IN SKIN DISEASES AND HEALTHY PEOPLE

Sennikova S.V.^a, Toptygina A.P.^{a,b}, Voropaeva E.A.^{a,c}

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

^b Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

^c N. Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russian Federation

Abstract. Alteration of microbiota composition is a trigger, and, sometimes, an etiological factor in the development of chronic skin diseases, e.g., psoriasis or eczema. Recognition of microflora by keratinocytes and immune cells leads to the production of antimicrobial peptides, chemokines and growth factors, which contribute to the differentiation of T lymphocytes to autoaggressive effector cells of Th1, Th17 and Th22 types that implement autoimmune inflammation in the psoriatic plaque. The aim of our work was to study the differences in the skin microbiota spectrum and the parameters of local immunity in capillary blood taken near the focus of inflammation in patients with autoimmune (psoriasis) and allergic (eczema) diseases compared with the parameters of healthy people. 24 patients with psoriasis (group 1), 20 patients with eczema (group 2) and 20 healthy adults (group 3) were examined. Biological materials were taken, i.e., the smears taken with sterile dry swab to the Amies transport medium with activated carbon, and capillary blood was taken in 2 microvets, 200 µL each) from the foci of inflammation on affected skin from the hands of patients, or from the fingers of healthy people. Inoculations of diagnostic media, microscopy with Gram staining and microbial identification were performed in a microbiological analyzer. Immunophenotyping of 22 subsets of mononuclear cells was performed by four-color staining of capillary blood with erythrocyte lysis and evaluation of subsets by a flow cytometer. Cytokines in blood plasma were determined by multiplex method. The spectrum of hand skin microflora of the group 3 was more diverse in the species composition. In patients with psoriasis and eczema, the coccal flora dominated, with a shift towards pathobionts in the microbiota spectrum. Activation of T and B cells, production of pro-inflammatory cytokines, IL-23/IL-17/IL-22 axis cytokines and cytokines – markers of epithelial cell damage (IL-25 and IL-33), as well as anti-inflammatory factors insufficiency were detected. Differences in changing parameters of the local immune status in patients with autoimmune (psoriasis) and allergic (eczema) diseases were revealed, thus reflecting the distinct features of immunopathogenesis in these diseases.

Keywords: psoriasis, eczema, subsets of lymphocytes, cytokines, capillary blood, microbiota

Введение

В последнее время большое внимание в патогенезе различных заболеваний уделяется микробиоте. Исследования, проводимые в разных областях, показали, что микробиота активно влияет на гомеостаз барьерных тканей и участвует в вос-

палительных реакциях иммунитета. Микробиота в различных сайтах барьерных тканей сильно варьирует. Так, на здоровой коже преобладает четыре типа: *Actinobacteria* (51,8%), *Firmicutes* (24,4%), *Proteobacteria* (16,5%) и *Bacteroidetes* (6,3%). Наиболее распространенными родами являются *Corynebacterium* spp. (22,8% от *Actinobacteria*),

Propionibacterium spp. (23,0% от *Actinobacteria*) и *Staphylococcus* spp. (16,8% от *Firmicutes*) [1].

Нарушение состава нормальной микробиоты является триггерным, а иногда и этиологическим фактором развития некоторых хронических заболеваний кожи. Например, псориаз — это хроническое иммуноассоциированное воспалительное заболевание кожи мультифакториальной природы. Показано, что нарушения в составе кожной микробиоты выступают в качестве основного триггера, запускающего развитие заболевания [2]. Распознавание микрофлоры с помощью Toll-подобных рецепторов кератиноцитами и иммунокомпетентными клетками врожденного иммунитета приводит к продукции антимикробных пептидов, таких как LL37, β -дефенсин и S100A7, а также хемокинов и ростовых факторов [3, 4]. Эти механизмы в норме позволяют противостоять патогенам, но из-за сбоя в регуляции механизмов врожденного и адаптивного иммунитета, защитные механизмы превращаются в аутоагрессивные [5]. LL37, связываясь с ДНК из разрушенных кератиноцитов, стимулирует плазмоцитоидные дендритные клетки к синтезу интерферонов I типа, которые запускают созревание классических дендритных клеток. Те, в свою очередь, презентуют аутоантигены Т-лимфоцитам, которые дифференцируются в аутоагрессивные эффекторы Th1-, Th17- и Th22-типов, реализующие аутоиммунное воспаление в псориатической бляшке. Этим сложным процессом дирижирует система цитокинов. На данный момент считается доказанным, что цитокиновая ось интерлейкинов (IL)-23/IL-17/IL-22 является ведущей в иммунопатогенезе псориаза. Эти цитокины, а также вовлеченные в процесс IFN γ , IL-21 и TNF вызывают активную пролиферацию кератиноцитов, привлекают новые провоспалительные клетки в зону псориатической бляшки, что приводит к утолщению эпидермиса и гиперкератозу, которые и формируют клинические симптомы — красные, зудящие, возвышающиеся над кожей бляшки, покрытые серебристыми чешуйками. Указанные цитокины формируют петлю обратной положительной связи, поддерживающую хроническое воспаление в псориатической бляшке [6].

Другим заболеванием кожи, напрямую связанным с нарушением микробиоты является экзема. Она относится к группе алергодерматозов и является хроническим рецидивирующим заболеванием, характеризующимся полиморфизмом высыпаний [7]. Нарушение микробиоты с преобладанием *S. aureus* и *C. albicans* является

триггером, запускающим воспаление, но затем эти микроорганизмы часто превращаются из антигена в аллерген в результате сенсибилизации и становятся этиологическим фактором экземы [8].

Целью работы было исследование различий в спектре микробиоты кожи и параметров локального иммунитета в капиллярной крови, взятой рядом с очагом воспаления у больных с аутоиммунным (псориаз) и аллергическим (экзема) заболеванием по сравнению с параметрами здоровых людей.

Материалы и методы

В рамках простого сравнительного исследования были обследованы 24 больных (19 мужчин и 5 женщин) с клинически подтвержденным диагнозом ладонно-подошвенный или обыкновенный псориаз с локализацией высыпаний на коже кистей рук легкой и средней степени тяжести — группа 1. Средний возраст пациентов составил 44,85 лет. Для оценки степени тяжести использовали индекс PASI (Psoriasis Area and Severity Index), среднее значение которого составило $11,1 \pm 0,44$ и дерматологический индекс шкалы симптомов (ДИШС), составивший $21,5 \pm 0,53$. В группу 2 вошли 20 больных (14 мужчин, 6 женщин), средний возраст пациентов составил 49,4 года с диагнозом хроническая экзема кожи ладонно-тыльной поверхности кистей рук острой стадии заболевания. Индекс тяжести EASI (Eczema Area and Severity Index) составил $3,21 \pm 0,9$ балла, а ДИШС — $20,05 \pm 0,82$. Критерием включения в группы пациентов было отсутствие использования топических средств в течение 1 месяца. Контрольную группу 3 составили 20 здоровых взрослых (15 мужчин и 5 женщин), средний возраст 46,6 года. Исследование было одобрено локальным этическим комитетом ФБУН МНИИЭМ им Г.Н. Габричевского (протокол № 52 от 29.01.2020), обследованные подписывали информированное согласие.

У всех вошедших в исследование людей был взят биологический материал: с площади 1 см^2 мазок стерильным сухим тампоном с очагов воспаления на коже кистей рук у пациентов или мазок с кожи кистей рук у здоровых обследуемых в транспортную систему Amies с активированным углем (Himedia, Индия). Также произведено взятие капиллярной крови из пальца руки у здоровых или рядом с очагом воспаления у пациентов в 2 микроветы по 200 мкл (Microvette 200 K3 EDTA).

Для исследования микрофлоры проводили посев исследуемого материала методом ис-

тошающего штриха на 5% кровяной агар с дефибрированной бараньей кровью (Blood Agar Base, Himedia, Индия), маннитно-солевой агар (Himedia, Индия), HiChrome UTI Agar (Himedia, Индия). Для выделения чистой культуры грибов использовался 1,5% декстрозный агар Сабуро (Himedia, Индия). Для выделения анаэробных микроорганизмов использовали агар Шедлера (Himedia, Индия). Посевы инкубировали в термостате в течение 18-24 часов в аэробных и анаэробных условиях. Видовую идентификацию микроорганизмов проводили с использованием микроскопии окрашенных по Граму препаратов чистых культур, дифференциально-диагностических питательных сред и биохимических тест систем. Видовую идентификацию также проводили на микробиологическом анализаторе VastoSCREEN (НПФ «Литех», Россия).

Иммунофенотипирование 19 субпопуляций лимфоцитов и 3 субпопуляций моноцитов проводили путем четырехцветного окрашивания

цельной капиллярной крови с лизированием эритроцитов и оценкой субпопуляций на проточном цитометре BD FACSantoII, программа сбора и обработки информации FACSDiva (BD, США). Использовали следующие маркеры: CD16-FITC, CD14-PE, CD45PerCP, CD3-FITC, CD16/56-PE, CD4-PerCP, CD8-APC, CD45RA-FITC, CD45R0-PE, CD161-APC, CD25-FITC, CD127-PE, CD249-APC, CXCR5-APC, CD27-FITC, CD1d-PE, CD5-PerCP, CD19-APC (BD Biosciences, США). Цитокины в плазме крови (IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22, IL-23, IL-25, IL-31, IL-33, IFN γ , TNF, sCD40L) определяли мультиплексным методом (MagPix, Bio Rad, США). Полученные результаты подвергли статистическим методам обработки. Уровень $p < 0,05$ считали значимым.

Результаты и обсуждение

Результаты исследования спектра микробиоты представлены в таблице 1. У больных псо-

ТАБЛИЦА 1. СПЕКТР МИКРОБИОТЫ КОЖИ РУК ИЗ ОЧАГА ВОСПАЛЕНИЯ У ДЕРМАТОЛОГИЧЕСКИХ БОЛЬНЫХ И ЗДОРОВЫХ ЛЮДЕЙ

TABLE 1. SPECTRUM OF THE HANDS SKIN MICROBIOTA FROM THE FOCUS OF INFLAMMATION IN DERMATOLOGICAL PATIENTS AND HEALTHY PEOPLE

	Группа 1 Group 1	Группа 2 Group 2	Группа 3 Group 3
<i>Staphylococcus spp.</i>	50%	55,55%	36,96%
<i>Micrococcus spp.</i>	23,21%	16,67%	13,04%
<i>Acinetobacter spp.</i>	3,57%	0%	4,35%
<i>Bacillus spp.</i>	3,57%	2,78%	8,70%
<i>Corynebacterium spp.</i>	3,57%	5,55%	8,70%
<i>Enterobacterales</i>	3,57%	0%	2,17%
<i>Moraxella spp.</i>	3,57%	2,78%	0%
<i>Actinomyces spp.</i>	1,79%	0%	0%
<i>Cryptococcus spp.</i>	1,79%	0%	0%
<i>Paenibacillus spp.</i>	1,79%	0%	0%
<i>Pseudomonas spp.</i>	1,79%	2,78%	0%
<i>Streptococcus spp.</i>	1,78%	0%	2,17%
<i>Lactobacillus spp.</i>	0%	0%	8,70%
<i>Candida spp.</i>	0%	0%	6,52%
<i>Brachybacterium spp.</i>	0%	0%	2,18%
<i>Kocuria spp.</i>	0%	0%	2,17%
<i>Neisseria spp.</i>	0%	0%	2,17%
<i>Rothia spp.</i>	0%	5,55%	2,17%
<i>Massilia spp.</i>	0%	2,78%	0%
<i>Microbacterium spp.</i>	0%	2,78%	0%
<i>Propionibacterium spp.</i>	0%	2,78%	0%

ТАБЛИЦА 2. ПАРАМЕТРЫ КЛЕТЧНОГО ИММУНИТЕТА КАПИЛЛЯРНОЙ КРОВИ ДЕРМАТОЛОГИЧЕСКИХ БОЛЬНЫХ В СРАВНЕНИИ СО ЗДОРОВЫМИ (M±SE, %)

TABLE 2. PARAMETERS OF CELLULAR IMMUNITY IN CAPILLARY BLOOD OF DERMATOLOGICAL PATIENTS COMPARED WITH HEALTHY ONES (M±SE, %)

	Группа 1 Group 1	Группа 2 Group 2	Группа 3 Group 3
CD45RA ⁺ /CD45RO ⁺	14,17±0,93*	15,77±0,96*	8,06±0,73
CD4 ⁺ CD294 ⁺	1,28±0,11	3,88±0,18*	1,68±0,19
CD25 ⁺ CD127 ⁺ CD4 ⁺	11,45±1,03*	10,04±1,01*	7,93±0,64
CD25 ⁺ CD127 ⁻ CD4 ⁺	9,29±0,58*	7,57±0,47*	5,91±0,36
CD45RO ⁺ CD4 ⁺ CD161 ⁺	15,66±1,47	22,35±1,84*	13,17±1,16
CD19 ⁺	14,69±1,16*	9,50±0,79	9,73±0,76
CD5 ⁺ CD19 ⁺	21,68±2,13*	13,54±0,97	13,33±1,07
CD1d ⁺ CD5 ⁺ CD19 ⁺	9,85±0,81*	7,21±0,69	6,29±0,53
CD27 ⁺ CD19 ⁺	15,79±1,17*	17,69±1,46	20,60±1,48
CD3 ⁺ CD16/56 ⁺	3,90±0,28*	6,91±0,43*	1,13±0,08
CD14 ^{hi} CD16 ⁻	80,67±1,73*	83,03±2,27	86,09±2,56
CD14 ^{lo} CD16 ^{hi}	8,15±0,66*	7,96±0,57*	4,88±0,30
CD14 ⁺ CD16 ^{int}	6,96±0,45*	5,85±0,42*	8,95±0,55

Примечание. * p < 0,05 по сравнению с соответствующим параметром группы здоровых людей.

Note. * p < 0.05 compared with the corresponding parameter of a group of healthy people.

ТАБЛИЦА 3. КОНЦЕНТРАЦИЯ ЦИТОКИНОВ (ПГ/МЛ) В ПЛАЗМЕ КАПИЛЛЯРНОЙ КРОВИ ДЕРМАТОЛОГИЧЕСКИХ БОЛЬНЫХ И ЗДОРОВЫХ ЛЮДЕЙ

TABLE 3. CONCENTRATION OF CYTOKINES (PG/ML) IN CAPILLARY BLOOD PLASMA OF DERMATOLOGICAL PATIENTS AND HEALTHY PEOPLE

	Группа 1 Group 1	Группа 2 Group 2	Группа 3 Group 3
IL-1	57,34±4,57*	47,31±3,15*	1,89±0,27
IL-4	15,40±1,31*	17,21±1,43*	2,53±0,31
IL-6	7,44±0,63*	8,15±0,77*	4,13±0,49
IL-10	3,67±0,47	6,73±0,56*	4,24±0,53
IL-17A	5,50±0,44*	8,84±0,63*	1,36±0,17
IL-17F	23,48±2,14*	21,93±2,09*	12,53±1,53
IL-21	55,68±4,23*	49,31±4,94*	7,99±1,11
IL-22	13,19±1,11*	12,63±1,21*	4,52±0,46
IL-23	26,71±2,12*	28,22±2,33*	6,86±0,89
IL-25	4,68±0,38*	5,17±0,42*	1,77±0,23
IL-31	519,40±48,47	697,43±49,12*	571,10±41,78
IL-33	44,19±4,22*	43,76±3,88*	19,22±2,11
IFN γ	16,54±1,39*	11,72±1,47	11,60±1,28
TNF	10,35±0,98*	9,78±0,89*	2,12±0,29
sCD40L	806,89±77,78*	350,64±31,48	340,34±32,13

Примечание. См. примечание к таблице 2.

Note. As for Table 2.

риазом было выделено 56 штаммов микроорганизмов. При этом преобладала кокковая флора: *Staphylococcus* spp. – 50,0% и *Micrococcus* spp. – 23,2%. Выявлен широкий видовой спектр коагулазотрицательных стафилококков, представленных такими видами как: *S. Epidermidis* – 12,37%, *S. Haemolyticus* – 7,25%, *S. Hominis* – 12,35%, *S. Capitis* – 5,52%, а *S. aureus* – только 3,17%, тогда как в группе здоровых – лишь 36,96% были отнесены к *Staphylococcus* spp., при этом выделялись в основном *S. Epidermidis* – 15,4% и другие коагулазотрицательные стафилококки. Известно, что *S. epidermidis* поддерживает гомеостаз кожи и препятствует росту условно патогенного *S. aureus* [11]. Почти в 2 раза чаще в группе 1 встречались *Micrococcus* spp., и, напротив, в 2 раза реже *Bacillus* spp. и *Corynebacterium* spp., чем в группе 3. Похожие результаты были получены группой Н.В. Chang, изменения в микробиоте у больных псориазом индуцировали ответ Th17 [12]. Более того, у больных псориазом вообще не были обнаружены *Lactobacillus* spp., *Candida* spp., *Brachybacterium* spp., *Kocuria* spp., *Neisseria* spp. и *Rothia* spp., составившие в группе здорового контроля 23,91% от состава микробиоты. В то же время, в группе больных псориазом были обнаружены отсутствовавшие в группе здорового контроля *Moraxella* spp., *Actinomyces* spp., *Cryptococcus* spp., *Paenibacillus* spp. и *Pseudomonas* spp., составившие 10,73% от состава микробиоты. В группе больных экземой было выделено 36 штаммов микроорганизмов. Доминировала кокковая флора, представленная *Staphylococcus* spp. – 55,5% и *Micrococcus* spp. – 17,7%, *S. aureus* – 12,6%, что превышало уровень не только здоровых, но и больных псориазом. В группе коагулазотрицательных стафилококков преобладал *S. epidermidis* – 27,8%, в единичных случаях выявлялись *S. haemolyticus*, *S. hominis* и *S. warneri*. *Bacillus* spp. и *Corynebacterium* spp. были снижены по сравнению с группой 3. У отдельных пациентов выявлялись такие условно-патогенные микроорганизмы как *B. cereus*, *Moraxella osloensis*, *Propionibacterium acnes*, *Pseudomonas monteilii*.

В капиллярной крови были оценены 22 субпопуляции мононуклеаров, однако для 9 субпопуляций значимых различий с группой здорового контроля не выявлено. Сопоставление параметров клеточного иммунитета значимо различающихся у больных с псориазом и экземой и здоровых людей представлены в таблице 2. Для некоторых субпопуляций значимые различия с группой здоровых были выявлены в обеих группах больных. Так, обнаружено значимое увеличение субпопуляций лимфоцитов

CD45RA⁺/CD45RO⁺, CD25⁺CD127⁺CD4⁺ (активированные хелперы), CD25⁺CD127⁻CD4⁺ (Treg), CD3⁺CD16/56⁺ (NKT). Первые 2 субпопуляции – это Т-лимфоциты, активно вовлеченные в процесс воспаления. Повышение Treg в обеих группах больных свидетельствует о попытках иммунной системы затормозить воспалительный процесс. В то же время наблюдалось значимое повышение уровней субпопуляций CD19⁺ (В-клетки), CD5⁺CD19⁺ (В1-клетки), CD1d⁺CD5⁺CD19⁺ (Breg) и значимое снижение субпопуляции CD27⁺CD19⁺ (В-клетки памяти) только в группе больных псориазом, а в группе больных экземой уровень этих субпопуляций не отличался от группы здорового контроля. Для группы больных экземой, но не для больных псориазом было характерно значимое увеличение уровней субпопуляций CD4⁺CD294⁺ (Th2) и CD45R0⁺CD4⁺CD161⁺ (Th17), что свидетельствует о вовлечении этих субпопуляций в патогенез экземы. Для моноцитов в обеих группах больных обнаружено значимое повышение уровней субпопуляции CD14^{lo}CD16^{hi} (M2) и значимое снижение уровней CD14⁺CD16^{int} (M-промежуточные). А в группе больных псориазом еще и значимое снижение моноцитов M1 (CD14^{hi}CD16⁻).

Результаты сопоставления цитокинового профиля капиллярной крови больных псориазом, экземой и здоровых людей представлены в таблице 3. Из 15 исследованных цитокинов в группе больных псориазом не отличались от группы здорового контроля только концентрации IL-10 и IL-31. Все остальные цитокины значимо превышали соответствующие показатели группы 3. В группе больных экземой не отличались от параметров группы 3 только IFN γ и sCD40L, тогда как остальные 13 цитокинов значимо превышали контрольные уровни. Эти особенности в профилях цитокинов, видимо, отражают тонкие механизмы иммунопатогенеза исследованных заболеваний. Помимо общей для них воспалительной реакции и повышения провоспалительных цитокинов, таких как IL-1, IL-6, IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22, IL-23 и TNF, отмечается также повышение цитокинов, секретируемых поврежденными кератиноцитами (IL-25 и IL-33), сигнализирующими о своем повреждении триггерными факторами. Выявляются также некоторые особенности. Так, для аутоиммунного (псориаз) заболевания типичным оказалось отсутствие подъема уровня IL-10 при увеличении количества Treg и Breg, его синтезирующего, что говорит о дефекте регуляторного звена при псориазе [10]. Тогда как при аллерги-

ческом заболевании (экзема) увеличение уровня Treg сопровождалось повышенной продукцией IL-10. Более того, для больных с экземой типичным было отсутствие повышения концентрации IFN γ , так как это цитокин Th1-хелперов, а аллергическое воспаление развивается по Th2- или Th17-типу, чьи цитокины были значимо повышены в этой группе больных. Так, уровень IL-4 в группе больных с экземой превышал уровень контрольной группы в 6,8 раза. Интересно, что у них, но не у больных псориазом, также был повышен уровень IL-31, который отвечает за чувство зуда у аллергических больных, тогда как у больных псориазом за это ощущение отвечает IL-33 [9].

Заключение

Таким образом, удалось показать, что спектр микрофлоры кожи рук обследованных контрольной группы был более разнообразным по видово-

му составу – 38,4%, микроорганизмов, представителей нормальной микрофлоры, не выявлялись у пациентов с псориазом и экземой. У пациентов с псориазом и экземой наблюдалось доминирование кокковой флоры, и выявлен сдвиг спектра микробиоты в сторону условно патогенных микроорганизмов, таких как *Acinetobacter* spp., *Enterobacteriales* spp., *Moraxella* spp., *Pseudomonas* spp. При этом дисбиоз кожи у больных сопровождается активацией Т- и В-клеток, продукцией провоспалительных цитокинов, цитокинов оси IL-23/IL-17/IL-22 и цитокинов – маркеров повреждения клеток эпителия (IL-25 и IL-33), а также недостаточностью противовоспалительных факторов (отсутствие повышения концентрации IL-10, несмотря на повышенный уровень Treg и Vreg). Выявлены различия в изменениях параметров локального иммунного статуса у больных с аутоиммунным (псориаз) и аллергическим (экзема) заболеваниями, отражающие особенности иммунопатогенеза этих заболеваний.

Список литературы / References

1. Теличко И.Н., Белоусова И.Э., Хайрутдинов В.Р. Дерматовенерология. Учебник. 3-е изд., перераб. и доп. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2016. 432 с. [Telichko I.N., Belousova I.E., Khairutdinov V.R. *Dermatovenereology. Textbook. 3rd ed., rev. and suppl.. Moscow: GEOTAR-Media, 2016. 432 p.*
2. Bodoor K., Al-Qarqaz F., Heis L.A., Alfaqih M.A., Oweis A.O., Almomani R., Obeidat M.A. IL-33/13 Axis and IL-4/31 axis play distinct roles in inflammatory process and itch in psoriasis and atopic dermatitis. *Clin. Cosmet. Investig. Dermatol.* 2020, Vol. 13, pp. 419-424.
3. Buchau A.S., Gallo R.L. Innate immunity and antimicrobial defense systems in psoriasis. *Clin. Dermatol.* 2007, Vol. 25, no. 6, pp. 616-624.
4. Chang H.W., Yan D., Singh R., Liu J., Lu X., Ucmak D., Lee K., Afifi L., Fadrosch D., Leech J., Vasquez K.S., Lowe M.M., Rosenblum M.D., Schar Schmidt T., Lynch S.V., Liao W. Alteration of the cutaneous microbiome in psoriasis and potential role in Th17 polarization. *Microbiome*, 2018, Vol. 6, 154. doi: 10.1186/s40168-018-0533-1.
5. Dainichi T., Kitoh A., Otsuka A., Nakajima S., Nomura T., Kaplan D.H., Kabashima K. The epithelial immune microenvironment (EIME) in atopic dermatitis and psoriasis. *Nat. Immunol.*, 2018, Vol. 19, no. 12, pp. 1286-1298.
6. Goodman W.A., Cooper K.D., McCormick T.S. Regulation generation: the suppressive functions of human regulatory T cells. *Crit. Rev. Immunol.*, 2012, Vol. 32, no. 1, pp. 65-79.
7. Grice E.A., Kong H.H., Conlan S., Deming C.B., Davis J., Young A.C., Bouffard G.G., Blakesley R.W., Murray P.R., Green E.D., Turner M.L., Segre J.A. Topographical and temporal diversity of the human skin microbiome. *Science*, 2009, Vol. 324, no. 5931, pp. 1190-1192.
8. Langan E.A., Griffiths C.E.M., Solbach W., Knobloch J.K., Zillikens D., Thaci D. The role of the microbiome in psoriasis: moving from disease description to treatment selection? *Br. J. Dermatol.*, 2018, Vol. 178, no. 5, pp. 1020-1027.
9. Nakamura Y., Oscherwitz J., Cease K.B., Chan S.M., Muñoz-Planillo R., Hasegawa M., Villaruz A.E., Cheung G.Y., McGavin M.J., Travers J.B., Otto M., Inohara N., Núñez G. Staphylococcus delta-toxin induces allergic skin disease by activating mast cells. *Nature*, 2013, Vol. 503, no. 7476, pp. 397-401.
10. Rendon A., Schäkel K. Psoriasis pathogenesis and treatment. *Int. J. Mol. Sci.*, 2019, Vol. 20, 1475. doi: 10.3390/ijms20061475.

11. Yerushalmi M., Elalouf O., Anderson M., Chandran V. The skin microbiome in psoriatic disease: a systematic review and critical appraisal. *J. Trans. Autoimmun.*, 2019, Vol. 2, 100009. doi: 10.1016/j.jtauto.2019.100009.

12. Zheng Y., Hunt R.L., Villaruz A.E., Fisher E.L., Liu R., Liu Q., Cheung G.Y.C., Li M., Otto M. Commensal *Staphylococcus epidermidis* contributes to skin barrier homeostasis by generating protective ceramides. *Cell Host Microbe*, 2022, Vol. 30, pp. 301-313.

Авторы:

Сенникова С.В. — аспирант лаборатории цитокинов ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора, Москва, Россия

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

Воропаева Е.А. — д.б.н., главный научный сотрудник, руководитель отдела медицинской биотехнологии ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора; профессор кафедры микробиологии и вирусологии ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Authors:

Sennikova S.V., Postgraduate Student, Laboratory of Cytokines, G. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation

Toptygina A.P., PhD, MD (Medicine), Professor, Chief Research Associate, Head of 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

Voropaeva E.A., PhD, MD (Biology), Chief Research Associate, Head of the Medical Biotechnology Department, G. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology; Professor, Department of Microbiology and Virology, Faculty of Biology, N. Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russian Federation

Поступила 30.06.2023
Принята к печати 12.07.2023

Received 30.06.2023
Accepted 12.07.2023

РОЛЬ NLRP3 В ИММУНОПАТОГЕНЕЗЕ НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ГЛАЗ

Балацкая Н.В.¹, Гаврилова Т.В.², Кинкулькина А.Р.^{3,4},
Авагян А.С.^{3,4}, Свитич О.А.^{3,4}

¹ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр глазных болезней имени Гельмгольца»
Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

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

³ ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва,
Россия

⁴ ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова»
Министерства здравоохранения РФ (Сеченовский университет), Москва, Россия

Резюме. Нейродегенеративная патология глаз является одной из ведущих причин слабости зрения и слепоты в мире. Первичная открытоугольная глаукома (ПОУГ) относится к группе нейродегенеративных офтальмопатологий и характеризуется постоянным или периодическим повышением внутриглазного давления с последующим развитием типичных дефектов поля зрения, снижением остроты зрения и атрофией зрительного нерва. Результаты исследований последних лет показывают, что в патогенезе ПОУГ важную роль играет локальное воспаление, запускаемое системой врожденного иммунитета – первой линией защиты организма от патогенов и продуктов тканевой деструкции. Целью работы было изучение локальной экспрессии мРНК рецепторного белка NLRP3 при моделировании нейродегенеративной офтальмопатологии в эксперименте у кроликов и сопоставление полученных данных с распределением аллелей и генотипов полиморфного маркера rs7525979 гена *NLRP3* у пациентов с ПОУГ. На первом этапе материалом исследования служили образцы тканевого комплекса сетчатки/ретиального пигментного эпителия (ТКС/РПЭ), выделенного из глаз 14 опытных кроликов и 7 здоровых кроликов без поражения глаз. Моделирование нейродегенеративной патологии глаза у кроликов проводилось в Экспериментальном Центре ФГБУ «НМИЦ ГБ им. Гельмгольца» Минздрава России путем однократного субретинального введения 0,01 мл 0,9% раствора хлорида натрия. Оценка уровней экспрессии генов *NLRP3* в образцах ТКС/РПЭ проводилась методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ). На втором этапе проводилось исследование образцов периферической крови людей, у которых была диагностирована ПОУГ различных стадий, а также без глаукомы. Из образцов крови выделялась ДНК, которая впоследствии была проанализирована на изучаемые полиморфные маркеры методом ПЦР-РВ. По результатам проведенного исследования

Адрес для переписки:

Кинкулькина Алия Ряшидовна
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин
и сывороток имени И.И. Мечникова»
105064, Россия, Москва, Малый Казенный пер., 5а.
Тел./факс: 8 (495) 917-49-00.
E-mail: mech.inst@mail.ru

Address for correspondence:

Aliya R. Kinkulkina
I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera
5a Maly Kazenny Ave
Moscow
105064 Russian Federation
Phone/fax: +7 (495) 917-49-00.
E-mail: mech.inst@mail.ru

Образец цитирования:

Н.В. Балацкая, Т.В. Гаврилова, А.Р. Кинкулькина,
А.С. Авагян, О.А. Свитич «Роль NLRP3
в иммунопатогенезе нейродегенеративных заболеваний
глаз» // Российский иммунологический журнал, 2023.
Т. 26, № 4. С. 485-490.
doi: 10.46235/1028-7221-13985-RON

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

For citation:

N.V. Balatskaya, T.V. Gavrilova, A.R. Kinkulkina,
O.A. Svitich, A.S. Avagyan "Role of NLRP3 in the
immunopathogenesis of neurodegenerative eye diseases",
Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii
Zhurnal, 2023, Vol. 26, no. 4, pp. 485-490.
doi: 10.46235/1028-7221-13985-RON

© Balatskaya N.V. et al., 2023
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.46235/1028-7221-13985-RON

отмечалось увеличение экспрессии гена *NLRP3* в ТКС/РПЭ глаз экспериментальных животных с моделированной дегенерацией сетчатки, а также выявлена ассоциация аллелей и генотипов гена *NLRP3* у пациентов с ПОУГ. Полученные данные, возможно, свидетельствует об участии компонентов инфламмосомы *NLRP3* в развитии нейродегенеративного поражения сетчатки при ПОУГ.

Ключевые слова: нейродегенерация, глаукома, инфламмосома, полиморфизм генов, врожденный иммунитет

ROLE OF NLRP3 IN THE IMMUNOPATHOGENESIS OF NEURODEGENERATIVE EYE DISEASES

Balatskaya N.V.^a, Gavrilova T.V.^b, Kinkulkina A.R.^{c,d}, Svitich O.A.^{c,d}, Avagyan A.S.^{c,d}

^a Helmholtz National Medical Research Center of Eye Diseases, Moscow, Russian Federation

^b E. Wagner Perm State Medical University, Perm, Russian Federation

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

^d I. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation

Abstract. Neurodegenerative eye pathology is one of the leading causes of visual impairment and blindness worldwide. Primary open-angle glaucoma (POAG) belongs to the group of neurodegenerative ophthalmic diseases and is characterized by a permanent or periodic increase in intraocular pressure, followed by development of typical visual field defects, decreased visual acuity and optic nerve atrophy. Recent studies show that local inflammation, triggered by the innate immune system is the first line of defense against the pathogens and tissue destruction products, playing an important role in the POAG pathogenesis. The aim was to study the neurodegenerative ophthalmic disorder in a rabbit model, and to compare the data on distribution of alleles and genotypes of the polymorphic marker rs7525979 of *NLRP3* gene in the patients with POAG. At the first stage, we studied the complex tissue samples of the retina/retinal pigment epithelium (TCS/RPE) isolated from the eyes of 14 experimental animals and 7 intact rabbits without eye damage. Neurodegenerative pathology of the eye in rabbits was carried out in the Experimental Center at the Helmholtz National Medical Research Center by a single subretinal injection of 0.01 ml of 0.9% sodium chloride solution. *NLRP3* gene expression levels in TCS/RPE samples were evaluated by real-time polymerase chain reaction (PCR-RV). At the second stage, peripheral blood samples were examined in patients who were diagnosed with POAG of various stages, as well as without glaucoma. DNA was isolated from blood samples, which was subsequently analyzed for the polymorphic markers study using PCR-RT technique. According to the results of the study, we noted an increased expression of the *NLRP3* gene in the TCS/RPE samples from experimental animals with simulated retinal degeneration. Moreover, an association of alleles and genotypes of the *NLRP3* gene was revealed in patients with POAG. The data obtained may be indicative for involvement of *NLRP3* inflammasome components in development of neurodegenerative retinal lesions in POAG.

Keywords: glaucoma, inflammasome, gene polymorphism, innate immunity

Введение

Нейродегенеративная патология глаз является ведущей причиной необратимого снижения центрального зрения и представляет собой гетерогенную группу заболеваний глаз, к которым относится глаукома. Недавно было подсчитано, что число людей с глаукомой во всем мире увеличится с 76,5 миллионов в 2020 году до 111,8 миллионов к 2040 году [8].

Первичная открытоугольная глаукома (ПОУГ) является многофакторным заболеванием. Повы-

шенное внутриглазное давление (ВГД) считается доказанным фактором риска развития глаукомной оптиконеуропатии (ГОН), однако до настоящего времени нет данных, объясняющих механизм повреждающего действия высокого внутриглазного давления [7]. Многими клиническими исследованиями было показано, что снижение ВГД позволяет предупредить развитие и прогрессирование ПОУГ [6, 7].

В развитии ПОУГ важная роль отводится локальному воспалительному ответу, индуцируемому звеном врожденного иммунитета – первой

линией защиты организма от патогенов и продуктов тканевой деструкции.

Большое значение в данном процессе имеют паттерн-распознающие рецепторы, PRRs, среди которых в аспекте нейродегенеративных заболеваний в настоящее время активно изучаются NOD-подобные молекулы (NLR), и в частности сенсорный белок NLRP3, участвующий в распознавании лигандов патогенов и эндогенных сигналов повреждения. После активации NLRP3 вместе с прокаспазой-1 и адаптерным белком ASC образуют инфламмасому – комплекс, который запускает процессинг незрелых форм цитокинов про-IL-1 β , про-IL-18 и активирует пироптоз.

Имеются данные, доказывающие, что формирование инфламмосом NLRP1, NLRP3 играет решающую роль в патогенезе острой глаукомы [2].

Похожие результаты получены в исследовании Yeghamothu P. и соавт.: так, ими продемонстрирована сборка инфламмосом NLRP1, NLRP3 при моделировании острой глаукомой с высоким ВГД у мышей [11].

В модели острой глаукомы быстрое повышение ВГД, согласно данным Chi W., индуцировало НМГВ1 опосредованную активацию инфламмосомы NLRP3 и продукцию зрелого IL-1 β [2].

При ингибировании НМГВ1 уровни NLRP3, IL-1 β снижались, что, в свою очередь, приводило к уменьшению гибели ганглиозных клеток сетчатки и стабилизации ее толщины. Ингибирование каспазы-8 подавляло сборку инфламмосомы NLRP3 и продукцию IL-1 β , что позволяет предположить наличие каспаза-8-сигнального пути активации NLRP1 и NLRP3 [3].

Также в исследовании Chi W. и соавт. было продемонстрировано, что в модели острого приступа глаукомы интравитреальное введение ингибиторов каспаз-1 и 8 значительно ослабляло остроту патологического процесса в глазу у экспериментальных животных [2].

Однако механизм участия инфламмосом в развитии нейродегенеративных заболеваний глаз остается невыясненным.

Структура и функциональная активность рецепторного белка NLRP3 и, соответственно, уровень воспалительного ответа зависят от полиморфных вариантов гена, кодирующего NLRP3 [10]. В последнее время появляются данные о взаимосвязи полиморфизмов NLRP3 с различными заболеваниями. Так, Katharine M. von Herrmann и соавт. показали, что полиморфные варианты rs7525979 гена *NLRP3* были связаны со значительным снижением риска развития Болезни Паркинсона [9]. В других научных работах обсуждается роль NLRP3 при глаукоме [4], однако данных о взаимосвязи полиморфизмов гена

NLRP3 с риском развития ПОУГ в мировой и отечественной литературе не представлено.

Целью работы было изучение локальной экспрессии мРНК рецепторного белка NLRP3 при моделировании нейродегенеративной офтальмопатологии в эксперименте у кроликов и сопоставление полученных данных с распределением аллелей и генотипов полиморфного маркера rs 7525979 гена NLRP3 у пациентов с ПОУГ.

Материалы и методы

В ходе работы проводилось молекулярно-биологическое исследование, материалом для которого служили 28 образцов ТКС/РПЭ с моделированной дегенерацией сетчатки, выделенных из глаз экспериментальных животных согласно стандартным протоколам. Исследование выполнено с соблюдением международных принципов Хельсинкской декларации о гуманном отношении к животным, принципов гуманности, изложенных в директиве Европейского Сообщества (86/609/ЕС) «Правила проведения работ с использованием экспериментальных животных».

Моделирование дегенеративного поражения сетчатки проводили в отделе патологии сетчатки и зрительного нерва ФГБУ «НМИЦ ГБ им. Гельмгольца» Минздрава России путем введения 14 кроликам (28 глаз) породы новозеландских альбиносов (опытная группа: возраст 2,5–3,0 мес., вес 2,0–2,5 кг) в субретинальное пространство на расстоянии 1–1,5 мм книзу от диска зрительного нерва 0,01 мл 0,9% раствора хлорида натрия с формированием субретинального пузыря согласно ранее разработанной методике [1]. О формировании нейродегенеративных изменений судили на основании изменений морфофункциональных параметров, полученных при проведении оптической когерентной томографии, исследовании аутофлюоресценции глазного дна, электроретинографии. В группу контроля были отнесены 7 соматически здоровых кроликов (14 глаз) без глазной патологии. Животных выводили из эксперимента методом воздушной эмболии после введения в наркоз (согласно приказу Минвуза СССР № 724 от 13.11.184), далее проводили энуклеацию глазных яблок. ТКС/РПЭ, выделенный из глаз, переносился в криопробирки и хранился при температуре -70 °С до проведения исследований. Образцы ТКС/РПЭ гомогенизировали. На следующем этапе выделяли мРНК с помощью набора Gene JET RNA Purification Kit (Thermo Scientific, США). Реакцию обратной транскрипции проводили с использованием набора ОТ-1 фирмы «Синтол» (Россия). Полученные фрагменты кДНК амплифицировали методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ) на термоциклере

ДТ-96 фирмы «ДНК-технология» (Россия). Для проведения ПЦР-РВ использовали наборы для определения экспрессии гена *NLRP3*, *GAPDH* («ДНК-синтез», Россия).

Для определения относительного количества кДНК в образце использовали метод нормированной экспрессии $\Delta\Delta Ct$. Результаты выражали в относительных единицах (отн. ед.).

Параллельно при проведении научной работы были изучены данные 238 пациентов в возрасте от 56 до 89 лет. На основании клинических и инструментальных исследования у 141 пациента диагностирована ПОУГ различных стадий, у остальных 97 пациентов признаки ПОУГ отсутствовали. Все пациенты подписывали информированное добровольное согласие на участие в исследованиях. Биоматериалом для проведения исследования служила венозная кровь: из нее при помощи коммерческих наборов «РИБО-сорб» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, РФ) была выделена ДНК, которая впоследствии была проанализирована на изучаемые полиморфные маркеры методом ПЦР-РВ. Для проведения ПЦР-РВ на исследование полиморфных маркеров в гене *NLRP3* были использованы готовые коммерческие наборы фирмы «ДНК-синтез» (Россия).

Количественные данные описывались с помощью медианы (Me) и нижнего и верхнего квартилей ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$), процентных долей. При сравнении групп применен U-критерий Манна-Уитни. Распределение долей аллелей и генотипов проверялось с помощью критерия хи-квадрат, критерия Фишера. Результаты описаны с помощью отношения шансов (ОШ) и 95% доверительного интервала для ОШ (ДИ). При оценке результатов статистически значимыми считали результаты при значениях $p \leq 0,05$. Анализ и визуализацию полученных данных проводили с использованием компьютерной программы для статистиче-

ской обработки данных – статистического пакета для социальных наук SPSS (Statistical Package for the Social Science).

Результаты и обсуждение

При исследовании экспрессии гена, кодирующего *NLRP3*, в ТКС/РПЭ животных основной группы и контроля выявлено, что дегенеративный процесс в сетчатке ассоциировался со значительным увеличением экспрессии гена *NLRP3* по сравнению с группой контроля.

Анализ экспрессии генов компонентов инфламмосомного комплекса *NLRP3* в группах кроликов представлен в таблице 1.

На следующем этапе для пациентов основной группы с ПОУГ и группы сравнения проводилось генотипирование полиморфизма в гене *NLRP3* (rs7525979). Результаты анализа представлены в таблице 2.

При исследовании распределения аллелей полиморфного маркера rs7525979 гена *NLRP3* было выявлено, что аллель Т ассоциирован с риском возникновения ПОУГ ($p \leq 0,05$). При исследовании аллеля С в основной группе относительно группы сравнения статистически значимых различий выявлено не было ($p > 0,05$). При исследовании распределения генотипов по полиморфному маркеру rs7525979 гена *NLRP3* было выявлено, что гетерозиготный генотип ТС значительно чаще встречался в группе пациентов с ПОУГ относительно группы сравнения и увеличивал риск развития заболевания в 2 раза ($p \leq 0,05$). Гомозиготный аллель СС значительно чаще встречался в группе сравнения, играя протективную роль ($p \leq 0,05$). При исследовании гомозиготного генотипа ТТ статистически значимых различий найдено не было.

ТАБЛИЦА 1. АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ КОМПОНЕНТОВ ИНФЛАММОСОМНОГО КОМПЛЕКСА *NLRP3* В ГРУППАХ ЖИВОТНЫХ

TABLE 1. ANALYSIS OF GENE EXPRESSION OF *NLRP3* INFLAMMASOME COMPLEX COMPONENTS IN ANIMAL GROUPS

Группа Group	Уровень экспрессии (отн. ед.) Expression level		
	<i>NLRP3</i>		
	Me	$Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$	p-value
Здоровые Healthy (n = 14)	0,0	0,0-24,4	0,004*
Дегенерация сетчатки Retinal degeneration (n = 14)	36,72	10,06-38,32	

Примечание. * – статистически значимые результаты; n – количество кроликов.
Note. *, statistically significant results; n, number of rabbits.

ТАБЛИЦА 2. РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ЧАСТОТ ГЕНОТИПОВ И АЛЛЕЛЕЙ ПО ПОЛИМОРФНЫМ ЛОКУСАМ ГЕНА *NLRP3* У ПАЦИЕНТОВ С ПОУГ И В ГРУППЕ СРАВНЕНИЯ

TABLE 2. DISTRIBUTION OF FREQUENCIES OF GENOTYPES AND ALLELES BY POLYMORPHISM OF THE *NLRP3* GENE IN PATIENTS WITH POAG AND CONTROL GROUP

Полиморфизм Polymorphism	Генотип / Аллель Genotype / allele	Группы Group		p-value, ОШ, ДИ OR, CI
		Пациенты с ПОУГ Patients with POAG (n = 141)	Группа сравнения Control group (n = 97)	
rs7525979	TC	0,42	0,17	$\chi^2 = 0,002$ p = 0,003 ОШ = 2,835 ДИ = 1,429-5,627
	TT	0,06	0,01	$\chi^2 = 0,14$ p = 0,24 ОШ = 4,27 ДИ = 0,505-36,015
	CC	0,52	0,82	$\chi^2 = 0,001$ p = 0,001 ОШ = 0,41 ДИ = 0,246-0,708
	T	0,79	0,21	$\chi^2 = 0,001$ p = 0,001 ОШ = 3,16 ДИ = 1,62-6,13
	C	0,61	0,39	$\chi^2 = 0,46$ p = 0,56 ОШ = 0,8 ДИ = 0,45-1,43

Примечание. n – количество пациентов.
Note. n, number of patients.

В последнее время появляется все больше данных о роли локального воспаления при развитии глаукомы. В своей работе Hui Chen и др. на модели острой глаукомы, выполненной на мышах линий C57BL/6, *NLRP12^{-/-}*, *GSDMD^{-/-}*, описали гибель ганглиозных клеток сетчатки, опосредованную действием пироптоза с участием в том числе инфламмосомного комплекса *NLRP3*, *NLRP12* [5]. Полученные нами данные на модели кроликов с дегенерацией сетчатки показали высокую экспрессионную активность гена *NLRP3*. При исследовании полиморфного маркера гена *NLRP3* в венозной крови пациентов с ПОУГ также были выявлены значимые ассоциативные связи. Все это указывает на большую роль гена *NLRP3* в иммунопатогенезе нейровоспаления и усилении нейродегенеративных процессов при ПОУГ.

Заключение

Для более глубокого понимания патогенеза развития нейродегенеративных патологий глаз, персонализированного подхода к лечению пациентов и прогнозирования у них течения заболеваний необходимо расширять наши знания о роли генетических факторов. В нашей работе мы изучили роль гена *NLRP3* в иммунопатогенезе нейровоспаления глаз на моделях *in vivo* и *in vitro* и выявили сопоставимую ассоциацию данного гена с риском развития нейродегенеративных процессов органа зрения. Эти данные могут быть использованы в разработках иммуномодулирующей терапии для предотвращения тяжелого течения и развития осложнений при нейродегенеративных патологиях глаз.

Список литературы / References

1. Нероева Н.В., Нероев В.В., Илюхин П.А., Кармокова А.Г., Лосанова О.А., Рябина М.В., Майбогин А.М. Моделирование атрофии ретинального пигментного эпителия // Российский офтальмологический журнал, 2020. Т. 13, № 4. С. 58-63. [Neroeva N.V., Neroev V.V., Ilyukhin P.A., Karmokova A.G., Lobanova O.A., Ryabina M.V., Maybogin A.M. Modeling of retinal pigment epithelium atrophy. *Rossiyskiy oftalmologicheskiy zhurnal = Russian Ophthalmological Journal*, 2020, Vol. 13, no. 4, pp. 58-63. (In Russ.)]. doi: 10.21516/2072-0076-2020-13-4-58-63.

2. Chi W., Li F., Chen H., Wang Y., Zhu Y., Yang X., Zhu J., Wu F., Ouyang H., Ge J., Weinreb R.N., Zhang K., Zhuo Y. Caspase-8 promotes NLRP1/NLRP3 inflammasome activation and IL-1 β production in acute glaucoma. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 2014, Vol. 111, pp. 11181-11186.
3. Chi W., Chen H., Li F., Zhu Y., Yin W., Zhuo Y. HMGB1 promotes the activation of NLRP3 and caspase-8 inflammasomes via NF-kappaB pathway in acute glaucoma. *J. Neuroinflamm.*, 2015, Vol. 12, 137. doi: 10.1186/s12974-015-0360-2.50.
4. Coyle S., Khan M.N., Chemaly M., Callaghan B., Doyle C., Willoughby C.E., Atkinson S.D., Gregory-Ksander M., McGilligan V. Targeting the NLRP3 Inflammasome in Glaucoma. *Biomolecules*, 2021, Vol. 1, no. 8, 1239. doi: 10.3390/biom11081239.
5. Chen H., Deng Y., Gan X., Li Y., Huang W., Lu L., Wei L., Su L., Luo J., Zou B., Hong Y., Cao Y., Liu Y., Chi W. NLRP12 collaborates with NLRP3 and NLRC4 to promote pyroptosis inducing ganglion cell death of acute glaucoma. *Mol. Neurodegener.*, 2020, Vol. 15, no. 1, 26. doi: 10.1186/s13024-020-00372-w.
6. Kauppinen A., Paterno J.J., Blasiak J., Kaarniranta K. Inflammation and its role in age-related macular degeneration. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2016, Vol. 73, pp. 1765-1786.
7. Shestopalov V.I., Spurlock M., Gramlich O.W., Kuehn M.H. Immune responses in the glaucomatous retina: regulation and dynamics. *Cells*, 2021, Vol. 10, 1973. doi: 10.3390/cells10081973.
8. Tham Y.C., Li X., Wong T.Y., Quigley H.A., Aung T., Cheng C.Y. Global prevalence of glaucoma and projections of glaucoma burden through 2040: a systematic review and meta-analysis. *Ophthalmology*, 2014, Vol. 121, no. 11, pp. 2081-2090.
9. von Herrmann K.M., Salas L.A., Martinez E.M., Young A.L., Howard J.M., Feldman M.S., Christensen B.C., Wilkins O.M., Lee S.L., Hickey W.F., Havrda M.C. NLRP3 expression in mesencephalic neurons and characterization of a rare NLRP3 polymorphism associated with decreased risk of Parkinson's disease. *N.P.J. Parkinsons Dis.*, 2018, Vol. 4, 24. doi:10.1038/s41531-018-0061-5.
10. Xu J., Núñez G. The NLRP3 inflammasome: activation and regulation. *Trends Biochem. Sci.*, 2023, Vol. 48, no. 4, pp. 331-344.
11. Yerramothu P., Vijay A.K., Willcox M.P. Inflammasomes, the eye and anti-inflammasome therapy. *Eye*, 2018, Vol. 32, pp. 491-505.

Авторы:

Балацкая Н.В. — к.б.н., ведущий научный сотрудник, начальник отдела иммунологии и вирусологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр глазных болезней имени Гельмгольца» Министерства здравоохранения РФ, Москва, 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

Кинкулькина А.Р. — аспирант кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии имени А.А. Воробьева Института общественного здоровья имени Ф.Ф. Эрисмана ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ (Сеченовский университет); младший научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

Свитич О.А. — д.м.н., член-корр. РАН, профессор кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии имени А.А. Воробьева Института общественного здоровья имени Ф.Ф. Эрисмана ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ (Сеченовский университет); директор ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

Авагян А.С. — студентка ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ (Сеченовский университет); лаборант лаборатории молекулярной иммунологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

Authors:

Balatskaya N.V., PhD (Biology), Leading Research Associate, Head, Department of Immunology and Virology, Helmholtz National Medical Research Center of Eye Diseases, Moscow, 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

Kinkulkina A.R., Postgraduate Student, Department of Microbiology, Virology and Immunology, F. Erisman Institute of Public Health, I. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University); Junior Research Associate, Laboratory of Molecular Immunology, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

Svitich O.A., PhD, MD (Medicine), Corresponding Member, Russian Academy of Sciences, Professor, Department of Microbiology, Virology and Immunology, F. Erisman Institute of Public Health, I. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University); Director, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

Avagyan A.S., Student, I. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University); Laboratory Assistant, Laboratory of Molecular Immunology, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

Поступила 10.07.2023
Принята к печати 12.07.2023

Received 10.07.2023
Accepted 12.07.2023

КООРДИНАЦИЯ СИГНАЛЬНОГО ПУТИ NF-κB И МЕТАБОЛИЗМА ЛИМФОЦИТОВ У ДЕТЕЙ С АУТОИММУННЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ

Курбатова О.В.¹, Радыгина Т.В.¹, Купцова Д.Г.¹, Петричук С.В.¹,
Мовсисян Г.Б.¹, Потапов А.С.^{1, 2}, Мурашкин Н.Н.^{1, 2, 3},
Абдуллаева Л.М.¹, 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

³ ФГБУ ДПО «Центральная государственная медицинская академия» Управления делами Президента Российской Федерации, Москва, Россия

Резюме. Метаболические абберации лежат в основе многих хронических заболеваний, в том числе аутоиммунных заболеваний (АИЗ). Иммунометаболизм (ИМ) — это область иммунологических исследований, активно развивающаяся и изучающая процессы метаболического перепрограммирования в иммунных клетках. Активно изучается регуляция активности ядерного фактора каппа В (NF-κB), который участвует в координации врожденного и адаптивного иммунитета, воспалительных реакций и других процессов. Изучение процессов ИМ и регуляции NF-κB является перспективным направлением для поиска новых терапевтических подходов в лечении АИЗ. Цель исследования — оценить информативность определения NF-κB и активность внутриклеточных дегидрогеназ лимфоцитов сукцинатдегидрогеназа (СДГ), глицерол-3-фосфатдегидрогеназа (ГФДГ) у детей с иммунозависимыми патологиями. Обследовано 350 детей с аутоиммунными заболеваниями: 97 пациентов с ВЗК, 72 ребенка с рецидивирующе-ремитирующим рассеянным склерозом (РС), 83 — с вульгарным псориазом (ПС) и 97 детей с аутоиммунным гепатитом (АИГ). Группу сравнения составили 100 условно здоровых детей. Активность СДГ и ГФДГ оценивали иммуноцитохимическим методом. Уровень транслокации NF-κB (% клеток с транслокацией NF-κB из цитоплазмы в ядро клетки) определяли методом проточной цитометрии с визуализацией. Статистические расчеты и построение графиков проводили с использованием программы Statistica 13.0. Наибольшая активность СДГ и ГФДГ выявлена в популяции

Адрес для переписки:

Курбатова Ольга Владимировна
ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения РФ
119991, Россия, Москва, Ломоносовский пр., 2, стр. 1.
Тел.: 8 (499) 134-13-98.
Факс: 8 (499) 134-70-01.
E-mail: putintseva@mail.ru

Address for correspondence:

Olga V. Kurbatova
National Medical Research Center for Children's Health,
Moscow, Russian Federation
2 Lomonosovsky Ave, Bldg 1
Moscow
119296 Russian Federation
Phone: +7 (499) 134-13-98.
Fax: +7 (499) 134-70-01.
E-mail: putintseva@mail.ru

Образец цитирования:

О.В. Курбатова, Т.В. Радыгина, Д.Г. Купцова, С.В. Петричук, Г.Б. Мовсисян, А.С. Потапов, Н.Н. Мурашкин, Л.М. Абдуллаева, А.П. Фисенко
«Координация сигнального пути NF-κB и метаболизма лимфоцитов у детей с аутоиммунными заболеваниями» // Российский иммунологический журнал, 2023. Т. 26, № 4. С. 491-500.
doi: 10.46235/1028-7221-13800-COT

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

For citation:

O.V. Kurbatova, T.V. Radygina, D.G. Kuptsova, S.V. Petrichuk, G.B. Movsisyan, A.S. Potapov, N.N. Murashkin, L.M. Abdullayeva, A.P. Fisenko
“Coordination of the NF-κB signaling pathway and lymphocyte metabolism in children with autoimmune diseases”, Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2023, Vol. 26, no. 4, pp. 491-500.
doi: 10.46235/1028-7221-13800-COT

© Kurbatova O.V. et al., 2023
The article can be used under the Creative Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.46235/1028-7221-13800-COT

цитотоксических Т-лимфоцитов и Т-хелперов, а наименьшая активность ферментов выявлена в популяции В-лимфоцитов как у детей с АИЗ, так и в группе сравнения. У детей с АИЗ выявлено значимое снижение активности СДГ в Т-лимфоцитах, цитотоксических Т-лимфоцитах, В-лимфоцитах и НК-клетках относительно группы сравнения ($p < 0,01$). У детей с ПС, АИГ и ВЗК выявлено снижение активности СДГ в Treg и Th17. Наиболее выраженное снижение ГФДГ характерно для пациентов с АИГ (в Т-лимфоцитах, цитотоксических Т-лимфоцитах, В-лимфоцитах, НК-клетках и Treg относительно группы сравнения). У детей с ПС активность ГФДГ снижена только в Treg ($p < 0,05$). Для детей с рассеянным склерозом выявлено снижение ГФДГ в популяциях Т-лимфоцитов, В-лимфоцитов и в активированных Т-хелперах ($p < 0,01$). В группе пациентов с ВЗК достоверных различий по активности ГФДГ относительно группы сравнения не выявлено. Выявлено значимое увеличение уровня транслокации NF-κB в Т-хелперах у всех детей с АИЗ относительно группы сравнения. У детей с АИГ и ПС выявлено значимое увеличение уровня транслокации NF-κB в Treg, Thact и Th17, у детей с рассеянным склерозом – в Treg, у пациентов с ВЗК – в Thact относительно группы сравнения ($p < 0,05$). Выявлена обратная корреляционная зависимость уровня транслокации NF-κB в популяциях лимфоцитов и активность митохондриальных дегидрогеназ лимфоцитов. Наиболее значимые зависимости характерны для популяций НК-клеток и Т-лимфоцитов и эти зависимости справедливы для всех групп пациентов с АИЗ. В результате экспериментов *in vitro* с препаратом метаболического действия, получено снижение количества клеток с транслокацией NF-κB и увеличение активности СДГ, степень активации СДГ зависела от популяции клеток, наибольшая выявлена в популяции Т-лимфоцитов – на 61%, в В-лимфоцитах – на 30%, в НК-клетках – на 19%. Исследование метаболической активности лимфоцитов и сигнального пути NF-κB позволяет судить об общих механизмах иммунопатологических процессов у детей с аутоиммунными заболеваниями различной этиологии. На основании установленной обратной корреляционной зависимости уровня транслокации NF-κB и активности СДГ в лимфоцитах можно рассматривать использование более доступного иммуноцитохимического метода в качестве аналога для оценки активности фактора транскрипции NF-κB. Изучение коррекции ИМ иммунокомпетентных клеток является перспективным направлением в лечении АИЗ.

Ключевые слова: дети, аутоиммунные заболевания, псориаз, рассеянный склероз, аутоиммунный гепатит, воспалительные заболевания кишечника, NF-κB, метаболизм лимфоцитов, иммунометаболизм, сукцинатдегидрогеназа, проточная цитометрия, проточная цитометрия с визуализацией

COORDINATION OF THE NF-κB SIGNALING PATHWAY AND LYMPHOCYTE METABOLISM IN CHILDREN WITH AUTOIMMUNE DISEASES

Kurbatova O.V.^a, Radygina T.V.^a, Kuptsova D.G.^a, Petrichuk S.V.^a, Movsisyan G.B.^a, Potapov A.S.^{a, b}, Murashkin N.N.^{a, b, c}, Abdullayeva L.M.^a, Fisenko A.P.^a

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

^b I. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation

^c Central State Medical Academy of Department of Presidential Affairs, Moscow, Russian Federation

Abstract. Metabolic aberrations underlie many chronic diseases, including autoimmune diseases (AUD). Immune metabolism is an area of immunological research that is actively developing and studying the processes of metabolic reprogramming in immune cells. The regulation of the nuclear factor kappa B (NF-κB) activity, which is involved in the coordination of innate and adaptive immunity, inflammatory reactions and other processes, is being actively studied. The studies on immune metabolism and regulation of NF-κB is a promising direction in searching for new therapeutic approaches in the AUD treatment. The aim of the present study was to evaluate the informative value of NF-κB and the activity of intracellular lymphocyte succinate dehydrogenase (SDH) and glycerol-3-phosphate dehydrogenase (GPDH) determined in children with immune-dependent disorders. 350 children with autoimmune diseases were examined: 97 patients with IBD, 72 children with

relapsing-remitting multiple sclerosis (MS), 83 pediatric patients with psoriasis vulgaris (PS), and 97 children with autoimmune hepatitis (AIH). The comparison group consisted of 100 conditionally healthy children. Activity of mitochondrial dehydrogenases, i.e., SDH and GPDH, was evaluated by immunocytochemical method. The levels of NF-κB translocation (per cent of cells with NF-κB translocation from cytoplasm to cell nucleus) was determined by flow cytometry, with visualization. Statistical evaluation and plotting were carried out using the Statistica 13.0 software. The highest activity of SDH and GPDH was detected in the population of cytotoxic T lymphocytes and T helper cells, and the lowest activity of the enzymes was registered in the population of B lymphocytes, both in children with AUD and in comparison group. In children with AUD, there was a significant decrease in SDH activity in T lymphocytes, cytotoxic T lymphocytes, B lymphocytes and NK cells against the comparison group ($p < 0.01$). In children with PS, AIH and IBD, a decrease in SDH activity was revealed in Treg and Th17 cells. The most pronounced decrease in GPDH was characteristic of patients with AIH (in T cells, cytotoxic T lymphocytes, B cells, NK cells and Tregs against the comparison group). In children with PS, the activity of GPDH was reduced only in Tregs ($p < 0.05$). For children with multiple sclerosis, a decrease in GPDH was revealed in populations of T lymphocytes, B lymphocytes and activated T helpers ($p < 0.01$). In the group of patients with IBD, there were no significant differences in the activity of GPDH relative to the comparison group. A significant increase in the level of NF-κB translocation in T helpers was revealed in all children with AUD relative to the comparison group. In children with AIH and PS, a significant increase in the level of NF-κB translocation was revealed in Treg, Thact and Th17 cells, in children with MS it was found in Treg cells, in patients with IBD, it was registered in Thact against the comparison group ($p < 0.05$). An inverse correlation was found between the levels of NF-κB translocation in lymphocyte populations, and activity of mitochondrial dehydrogenases in the lymphocytes. The most significant dependencies are characteristic of NK cells and T cell populations, and these correlations are valid for all groups of AUD patients. In the course of *in vitro* experiments with a drug of metabolic action, a decreased number of cells with NF-κB translocation and an increased SDH activity was observed; the degree of SDH activation depended on the cell population type, the greatest changes were detectable in the population of T lymphocytes (by 61%), in B lymphocytes (by 30%), in NK cells (by 19%). The study of the metabolic activity of lymphocytes and the NF-κB signaling pathway allows us to assess the general mechanisms of immunopathological processes in children with autoimmune diseases of various etiologies. As based on the inverse correlation between the level of translocation of NF-κB and the activity of SDH in lymphocytes, one may consider the use of an available immunocytochemical method being an analogue for assessing activity of the NF-κB transcription factor. The studies of immune metabolic correction of immunocompetent cells are a promising direction in the AUD treatment.

Keywords: children, autoimmune diseases, psoriasis, multiple sclerosis, autoimmune hepatitis, inflammatory bowel diseases, NF-κB, lymphocyte metabolism, immunometabolism, succinate dehydrogenase, flow cytometry, flow cytometry with visualization

Введение

Частота заболеваемости аутоиммунными заболеваниями (АИЗ) ежегодно увеличивается во всем мире. По оценкам недавно проведенного популяционного исследования 10% населения земного шара страдает АИЗ [7]. Несмотря на широкий арсенал препаратов, применяющихся для лечения пациентов с АИЗ, остается потребность в идентификации биомаркеров, прогнозирующих ответ на терапию и корректную оценку состояния пациентов [5]. Иммунометаболизм — это область иммунологических исследований, активно развивающаяся и изучающая процессы метаболического перепрограммирования в иммунных клетках. Во время иммунного ответа клетки переходят из метаболического покоя в активную фазу, что сопровождается метаболическим сдвигом от катаболического к анаболическому состоянию [15].

В состоянии покоя макромолекулы проходят катаболические пути для получения энергии и обеспечения долгосрочного выживания. Метаболические абберации лежат в основе многих хронических заболеваний, в том числе АИЗ. Цикл трикарбоновых кислот (ТКА), окислительное фосфорилирование (ОХРНОС) и окисление жирных кислот (ЖАО), важны для дифференцировки Т-клеток [6]. Наивные Т-клетки имеют низкую скорость метаболизма и минимальные потребности в биосинтезе используют для получения энергии небольшое количество глюкозы, глутамина и жирных кислот, посредством ОХРНОС. Эффекторные Т-клетки (Teff) значительно увеличивают скорость метаболизма после иммунной активации из-за пролиферативной экспансии и индукции энергоемких эффекторных функций, включая продукцию большого количества цитокинов [10]. В регуляторных Т-клетках (Treg) ак-

тивен процесс OXPHOS, который подпитывается экзогенными жирными кислотами, импортируемыми и метаболизируемыми посредством FAO, во время клеточного деления Treg переходят на гликолитический метаболизм, чтобы поддержать биосинтетические потребности для их роста и пролиферации. Дифференцировка клеток зависит от клеточного окружения и субстратов для метаболических путей [9]. Нарушение клеточного метаболизма в Treg приводит к нарушению их функции и изменяет дифференцировку Т-клеток в сторону Teff и клеток памяти [11].

В последние годы, наряду с иммунометаболизмом клеток, активно изучается регуляция активности ядерного фактора каппа В (NF-κB). NF-κB является ключевым фактором транскрипции, участвующим в координации врожденного и адаптивного иммунитета, воспалительных реакций и других процессов, таких как клеточная дифференцировка, пролиферация и выживание [12]. Дисрегуляция NF-κB связана с широким спектром заболеваний, от воспалительных и иммунных нарушений до рака. Нарушение регуляции пути NF-κB и факторов, которые его регулируют, приводит к состоянию неконтролируемого воспаления, включая аутоиммунное [13]. Также, NF-κB влияет на митохондриальные пути, такие как окислительное фосфорилирование, где субъединица р65 способствует митохондриальной экспрессии фактора сборки цитохром С-оксидазы 2 и активации окислительного фосфорилирования [8]. Продемонстрировано, что NF-κB регулирует гликолиз и митохондриальное дыхание в зависимости от наличия р53 в клетках [8]. Изучение процессов иммунометаболизма и регуляции NF-κB является перспективным направлением для поиска новых терапевтических подходов в лечении АИЗ.

Цель исследования — оценить информативность определения NF-κB и активность внутриклеточных дегидрогеназ лимфоцитов (СДГ, а-ГФДГ) у детей с иммунозависимыми патологиями.

Материалы и методы

Обследовано 350 детей с аутоиммунными заболеваниями: 97 пациентов с ВЗК в возрасте 12,6 (8,3-16,1) лет, 72 ребенка с рецидивирующе-ремитирующим рассеянным склерозом (РС) в возрасте 17,0 (15,7-17,8) лет, 83 — с вульгарным псориазом (ПС) в возрасте 12,1 (7,8-15,8) лет и 97 детей с аутоиммунным гепатитом (АИГ) в возрасте 14,3 (10,9-16,6) лет. В группы были включены дети с АИЗ с разной тяжестью заболевания как в обострении, так и в ремиссии. Группу сравнения составили 100 условно здоровых детей в возрасте

12,2 (10,3-17,3) лет, не имеющие отклонений от нормативных показателей в стандартном клиническом и биохимическом лабораторном исследовании, а также при отсутствии на момент обследования острых состояний, травм, аутоиммунных, онкологических и психических заболеваний.

Исследование одобрено локальным этическим комитетом ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России, проведено в соответствии с этическими и нормативными документами Российской Федерации. В соответствии с Хельсинкской декларацией перед исследованием было получено информированное согласие родителей (для детей младше 14 лет) и детей (старше 14 лет) для всех обследованных групп. Образцы венозной крови для исследования получали натощак из локтевой вены в пробирки BD Vacutainer® с антикоагулянтом K₂ЭДТА. Исследование активности митохондриальных дегидрогеназ и определение уровня транслокации NF-κB выполняли в день забора крови.

Активность митохондриальных дегидрогеназ — сукцинатдегидрогеназы (СДГ) и глицеро-3-фосфатдегидрогеназы (ГФДГ) — оценивали иммуноцитохимическим методом [2]. Метод основан на изменении показателей гранулярности клетки до и после проведения цитохимической реакции (со специфическим субстратом для каждого фермента) в пермеабиллизированных клетках лимфоконцентрата. Ферментативную активность оценивали по отношению показателя бокового светорассеяния (SSC) после и до проведения реакции, умноженным на 100. Активность дегидрогеназ определяли в следующих популяциях лимфоцитов в регионе CD45⁺: Т-лимфоцитах (CD3⁺), В-лимфоцитах (CD19⁺CD3⁻), NK-клетках (CD3⁻CD16⁺CD56⁺), Т-хелперах (CD3⁺CD4⁺), цитотоксических Т-лимфоцитах (CD3⁺CD8⁺), Th17-лимфоцитах (Th17, CD3⁺CD4⁺CD161⁺), регуляторных Т-клетках (Treg, CD3⁺CD4⁺CD127^{low}), активированных Т-хелперах (Thact, CD3⁺CD4⁺CD127^{high}). Исследование выполняли на проточных цитометрах CYTOMICS FC500 и Novocyte с использованием моноклональных антител производства Beckman Coulter (США). Уровень транслокации NF-κB (% клеток с транслокацией NF-κB из цитоплазмы в ядро клетки) определяли методом проточной цитометрии с визуализацией (Amnis ImageStreamX Mk II) с применением набора Amnis NF-κB Translocation Kit (Luminex, США). Визуализацию и запись клеток выполняли при 40-кратном увеличении и низкой скорости потока, анализировали изображения отдельных клеток в хорошем фокусе. Для двойных позитивных клеток — NF-κB⁺/7-AAD⁺ по параметру Similarity

> 1 определяли процент клеток с транслокацией NF-κB в популяциях лимфоцитов.

Статистические расчеты и построение графиков проводили с использованием программы Statistica 13.0 (StatSoft, США). Описательная статистика представлена в виде медианы $Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})$. Различия между группами оценивали критерием Манна–Уитни. Статистически достоверными отличиями считали при $p < 0,05$. Исследования взаимосвязи между активностью СДГ и уровнем транслокации NF-κB в популяциях лимфоцитов выполняли с помощью корреляционного анализа.

Результаты и обсуждение

Проведенный анализ активности митохондриальных дегидрогеназ в популяциях лимфоцитов показал, что наибольшей активностью СДГ и ГФДГ обладают популяции цитотоксических Т-лимфоцитов и Т-хелперов, а наименьшая активность ферментов выявлена в популяции В-лимфоцитов как у детей с АИЗ, так и в группе сравнения (табл. 1). Активность СДГ и ГФДГ в НК-клетках выше, чем в В-лимфоцитах и ниже, чем в Т-лимфоцитах ($p < 0,01$).

У детей с АИЗ выявлено значимое снижение активности СДГ в Т-лимфоцитах, цитотоксических Т-лимфоцитах, В-лимфоцитах и НК-клетках относительно группы сравнения ($p < 0,01$; табл. 1). У пациентов с ВЗК выявлено снижение СДГ также в популяции Т-хелперов. Анализ малых популяций лимфоцитов показал снижение активности СДГ в Treg и Th17 у детей с псориазом, АИГ и ВЗК (табл. 1). Полученные данные о снижении активности СДГ согласуются с данными Chen X. о том, что дефицит СДГ в Т-клетках может вызывать дефекты пролиферации и выживания клеток, индуцировать сигнатуру провоспалительного гена в Т-клетках и способствовать дифференцировке эффекторных Th1- и Th17-клеток [7].

Наиболее выраженное снижение ГФДГ характерно для пациентов с АИГ: активность фермента была значимо снижена в Т-лимфоцитах, цитотоксических Т-лимфоцитах, В-лимфоцитах, НК-клетках и Treg относительно группы сравнения (табл. 1). У детей с псориазом активность ГФДГ снижена только в Treg ($p < 0,05$). Для детей с рассеянным склерозом выявлено снижение ГФДГ в популяциях Т-лимфоцитов, В-лимфоцитов и в активированных Т-хелперах ($p < 0,01$). В группе пациентов с ВЗК достоверных различий по активности ГФДГ относительно группы сравнения не выявлено (табл. 1).

Ранее мы показали, что уровень транслокации NF-κB в популяциях лимфоцитов определяется

тяжестью состояния пациента и зависит от популяции клеток [1, 3]. Состояние обострения заболевания характеризуется активацией фактора транскрипции NF-κB в популяциях лимфоцитов у детей с АИЗ. Максимальное количество клеток с транслокацией NF-κB у всех обследованных детей выявлено в В-лимфоцитах и составляет около 50% популяции, а наименьшее – в популяции Т-лимфоцитов и субпопуляциях CD4⁺Т-клеток (табл. 1).

Для пациентов с АИЗ, вошедших в исследование, уровень транслокации NF-κB изменялся от 6,0 до 99% и зависел от популяции клеток. Выявлено значимое увеличение уровня транслокации NF-κB в Т-хелперах у всех детей с АИЗ относительно группы сравнения (табл. 1). У детей с АИГ и псориазом выявлено значимое увеличение уровня транслокации NF-κB в Treg, Thact и Th17 (табл. 1). Активность NF-κB в Treg была повышена у детей с рассеянным склерозом, в Thact – у пациентов с ВЗК относительно группы сравнения ($p < 0,05$). Полученные данные подтверждают важную роль сигналов NF-κB, нарушения передачи которых способствуют патогенезу иммунологических нарушений при аутоиммунных нарушениях [14].

Следующий этап работы включал определение зависимости между уровнем транслокации NF-κB и активностью митохондриальных дегидрогеназ в лимфоцитах у детей с АИЗ и в группе сравнения. В группе сравнения анализ показал обратную корреляционную зависимость: чем выше уровень транслокации NF-κB в популяциях лимфоцитов, тем ниже активность СДГ ($r = -0,49$; $p < 0,001$) и ГФДГ ($r = -0,31$; $p = 0,001$). Выявлена аналогичная обратная зависимость между уровнем транслокации NF-κB и активностью СДГ для детей с РС ($r = -0,65$; $p < 0,001$), с АИГ ($r = -0,63$; $p < 0,001$), с ВЗК ($r = -0,56$; $p < 0,001$) и псориазом ($r = -0,57$; $p < 0,001$; рис. 1). Зависимость уровня транслокации NF-κB и активности ГФДГ в популяциях лимфоцитов менее выражена из-за большого разброса показателей.

Анализ выявленной зависимости уровня транслокации NF-κB и активности СДГ в отдельных популяциях показал, что наиболее значимые зависимости характерны для популяций НК-клеток и Т-лимфоцитов и эти зависимости справедливы для всех групп пациентов с АИЗ. Для популяций НК-клеток: при РС составила $r = -0,58$; $p < 0,001$, при псориазе – $r = -0,51$; $p < 0,001$, при АИГ $r = -0,46$; $p < 0,001$ и при ВЗК- $r = -0,22$; $p = 0,033$. Для популяций Т-лимфоцитов: при РС составила $r = -0,51$; $p < 0,001$, при псориазе – $r = -0,31$; $p = 0,03$, при АИГ $r = -0,27$; $p = 0,049$ и при ВЗК- $r = -0,24$; $p = 0,018$.

ТАБЛИЦА 1. АКТИВНОСТЬ МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ ДЕГИДРОГЕНАЗ И УРОВЕНЬ ТРАНСЛОКАЦИИ NF-κB В ПОПУЛЯЦИЯХ ЛИМФОЦИТОВ У ДЕТЕЙ С АУТОИММУННЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ И В ГРУППЕ СРАВНЕНИЯ

TABLE 1. ACTIVITY OF MITOCHONDRIAL DEHYDROGENASES AND THE LEVEL OF NF-κB TRANSLOCATION IN POPULATIONS OF LYMPHOCYTES IN CHILDREN WITH AUTOIMMUNE DISEASES AND IN THE COMPARISON GROUP

Популяция клеток Cell population	Группа сравнения Comparison group (n = 100)	Псориаз Psoriasis	АИГ AID	ВЗК IBD	РС MS
		(n = 83)	(n = 98)	(n = 97)	(n = 72)
Активность СДГ, усл. ед. Activity of SDH, c. u.					
Т-лимфоциты T lymphocytes	193	178**	175**	178**	179**
	(184-200)	(167-190)	(162-187)	(167-191)	(163-185)
Т-хелперы T helpers	191	187	183	183**	191
	(182-201)	(174-192)	(170-202)	(174-195)	(171-200)
Цитотоксические Т-лимфоциты Cytotoxic T lymphocytes	196	178**	168**	175**	176**
	(184-204)	(163-196)	(156-177)	(165-190)	(159-189)
В-лимфоциты B lymphocytes	148	129**	129**	134**	130**
	(137-155)	(122-141)	(122-140)	(127-144)	(121-143)
НК-клетки NK cells	179	159**	155**	157**	165*
	(169-190)	(134-184)	(139-174)	(145-172)	(147-188)
Регуляторные Т-клетки Treg	196	184**	188**	185**	195
	(187-211)	(174-196)	(172-204)	(174-199)	(174-204)
Активированные Т-хелперы Thact	198	198	197	193	205
	(187-208)	(185-206)	(179-218)	(183-206)	(177-215)
Th17-лимфоциты Th17	189	179**	171**	178**	187
	(178-201)	(164-190)	(160-193)	(167-186)	(162-193)
Активность ГФДГ, усл. ед. Activity of GFDH, c. u.					
Т-лимфоциты T lymphocytes	168	165	156**	168	161**
	(156-179)	(159-176)	(143-165)	(158-176)	(132-169)
Т-хелперы T helpers	157	166	155	167	163
	(146-179)	(155-174)	(146-166)	(150-172)	(134-171)
Цитотоксические Т-лимфоциты Cytotoxic T lymphocytes	166	169	150*	170	160
	(149-181)	(161-174)	(141-160)	(156-179)	(132-169)
В-лимфоциты B lymphocytes	151	144	138**	148	138**
	(144-159)	(130-157)	(122-150)	(136-161)	(117-148)
НК-клетки NK cells	164	166	149**	163	157
	(152-174)	(155-179)	(132-169)	(152-173)	(136-175)
Регуляторные Т-клетки Treg	179	175*	167*	175	172
	(166-191)	(161-185)	(155-182)	(157-185)	(140-186)

Таблица 1 (окончание)
Table 1 (continued)

Популяция клеток Cell population	Группа сравнения Comparison group (n = 100)	Псориаз Psoriasis	АИГ AID	ВЗК IBD	РС MS
		(n = 83)	(n = 98)	(n = 97)	(n = 72)
Активированные Т-хелперы Thact	177	180	172	177	152**
	(170-196)	(174-190)	(158-186)	(164-190)	(136-175)
Th17-лимфоциты Th17	158	166	161	163	163
	(153-186)	(160-174)	(149-180)	(151-177)	(131-172)
Уровень транслокации NF-κB, % NF-κB translocation level, %					
Т-лимфоциты T lymphocytes	17,8	19	20,6**	18,7	19
	(16,4-21,1)	(15,3-25,7)	(17,3-26,5)	(15,1-22,8)	(15,3-27,3)
Т-хелперы T helpers	16,5	19,3**	21,2**	19,4*	19,9**
	(14,0-18,4)	(16,4-28,4)	(17,4-28,7)	(14,7-22,6)	(16,7-25,7)
Цитотоксические Т-лимфоциты Cytotoxic T lymphocytes	17,8	17,7	19,2	17	17,6
	(15,6-23,5)	(13,9-23,4)	(15,9-24,3)	(14,1-20,7)	(13,6-23,8)
В-лимфоциты B lymphocytes	48,5	44,8	54,7	53,3	53,4
	(40,1-79,9)	(35,4-53,5)	(39,9-69,5)	(41,0-70,1)	(37,0-62,1)
NK-клетки NK cells	29,8	22	33,7	27,4	26
	(20,2-37,1)	(19,4-36,0)	(22,6-46,0)	(21,4-44,9)	(21,6-38,5)
Регуляторные Т-клетки Treg	19,2	24,1**	26,6**	21,4	22,3*
	(13,5-23,5)	(20,5-27,6)	(20,4-35,0)	(17,1-26,0)	(18,6-30,9)
Активированные Т-хелперы Thact	15,2	19,3*	19,5**	18,5*	17
	(14,5-16,8)	(15,0-22,2)	(15,1-26,1)	(12,9-23,5)	(13,5-25,0)
Th17-лимфоциты Th17	18,1	20,7*	20,5*	20,4	21
	(17,0-20,3)	(16,9-29,8)	(16,6-25,0)	(15,6-24,0)	(14,3-28,8)

Примечание. * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$.

Note. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$.

Помимо этого, у пациентов с АИГ выявлена значимая зависимость уровня транслокации NF-κB и активности СДГ для Th17-клеток ($R = -0,34$), а у пациентов с РС – в Т-хелперах ($r = -0,33$; $p = 0,01$) и Т-цитотоксических лимфоцитах ($r = -0,5$; $p < 0,001$). У детей с ВЗК, помимо NK-клеток и Т-лимфоцитов, корреляция уровня транслокации NF-κB и активности СДГ получена для Treg ($r = -0,22$; $p = 0,04$) и Thact ($r = -0,25$; $p = 0,017$). Выявленное в нашей работе сопряжение активности СДГ с уровнем транслокации NF-κB у детей с аутоиммунными заболеваниями с одной стороны может свидетельствовать о влиянии сигнального пути NF-κB на

активность митохондриальных дегидрогеназ, а с другой стороны, возможно, что изменение метаболизма способствует активации сигнального пути NF-κB. Иммунометаболические пути можно рассматривать как потенциальную мишень для коррекции сигнального пути NF-κB, с целью предотвращения аутоиммунно направленных воспалительных реакций [2].

В результате экспериментов *in vitro* с препаратом метаболического действия, в состав которого входят янтарная кислота, рибофлавин (витамин В2), никотинамид (витамин РР) и инозин, у пациентов с ВЗК показано его стимулирующее действие на активность СДГ после 40

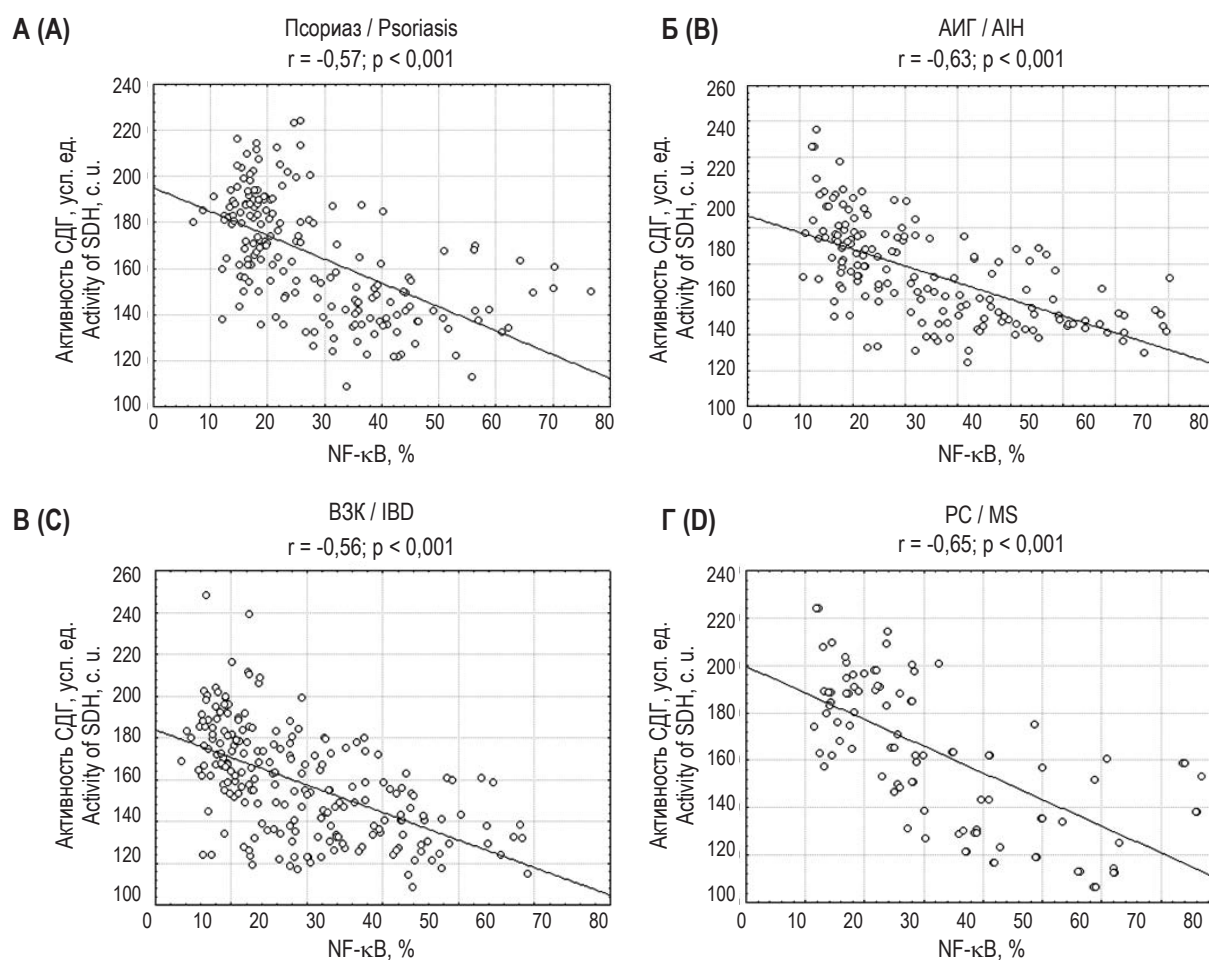


Рисунок 1. Зависимость активности СДГ и уровня транслокации NF-κB в лимфоцитах у детей с псориазом (А), аутоиммунным гепатитом (Б), воспалительными заболеваниями кишечника (В) и рассеянным склерозом (Г)

Figure 1. Dependence of SDH activity and the level of NF-κB translocation in lymphocytes in children with psoriasis (A), autoimmune hepatitis (B), inflammatory bowel disease (C), and multiple sclerosis (D)

минут инкубации цельной крови с физиологической дозой препарата, рассчитанной на килограмм массы тела пациента в пересчете на объем циркулирующей крови. При этом получено снижение количества клеток с транслокацией NF-κB в основных популяциях лимфоцитов после инкубации с препаратом. Степень активации СДГ зависела от популяции клеток, наибольшая выявлена в популяции Т-лимфоцитов – на 61%, в В-лимфоцитах – на 30%, в НК-клетках – на 19% относительно пробы без препарата метаболического действия. Отмечено снижение активности NF-κB на 14% в Т-лимфоцитах, на 11% в В-лимфоцитах и на 29% – в НК-клетках. Данный факт позволяет предположить, что улучшая метаболизм клеток с помощью препаратов метаболического действия в условиях *in vivo*, возможно будет снизить активацию сигнального пути NF-κB и уменьшить синтез провоспалительных цитокинов [12]. Однако данное направление требует

более детального изучения и проведения дополнительных исследований.

Заключение

Исследование метаболической активности лимфоцитов и сигнального пути NF-κB позволяет судить об общих механизмах иммунопатологических процессов у детей с аутоиммунными заболеваниями различной этиологии. На основании установленной обратной корреляционной зависимости уровня транслокации NF-κB и активности СДГ в лимфоцитах можно рассматривать использование более доступного иммуноцитохимического метода в качестве аналога для оценки активности фактора транскрипции NF-κB. Изучение коррекции иммунометаболизма иммунокомпетентных клеток является перспективным направлением в лечении аутоиммунных заболеваний.

Список литературы / References

1. Купцова Д.Г., Петричук С.В., Мурашкин Н.Н., Курбатова О.В., Радыгина Т.В., Хотко А.А., Иванов Р.А. Активность ядерного фактора транскрипции κB в популяциях лимфоцитов у детей с псориазом // Вестник РГМУ, 2022. № 2. С. 30-38. [Kuptsova D.G., Petrichuk S.V., Murashkin N.N., Kurbatova O.V., Radygina T.V., Khotko A.A., Ivanov R.A. Activity of nuclear factor κB in lymphocyte populations of children with psoriasis. *Vestnik RGMU = Bulletin of Russian State Medical University*, 2022, no. 2, pp. 28-35. (In Russ.)]
2. Курбатова О.В., Купцова Д.Г., Закиров Р.Ш., Радыгина Т.В., Мовсисян Г.Б., Фрейдлин Е.В., Семикина Е.Л., Потапов А.С., Мурашкин Н.Н., Петричук С.В. Перспективы изучения иммунометаболизма в клинической практике // Вестник Ташкентской медицинской академии, 2023. № 3 (1). С. 98-104. [Kurbatova O.V., Kuptsova D.G., Zakirov R.Sh., Radygina T.V., Movsisyan G.B., Freidlin E.V., Semikina E.L., Potapov A.S., Murashkin N.N., Petrichuk S.V. Prospects for the study of immunometabolism in clinical practice. *Vestnik Tashkentsoy meditsinskoy akademii = Bulletin of the Tashkent Medical Academy*, 2023, no. 3 (1), pp. 98-104. (In Russ.)]
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 immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2022, Vol. 25, no. 4, pp. 491-498. (In Russ.)] doi: 10.46235/1028-7221-1191-EOA.
4. Andres-Ejarque R., Ale H.B., Grys K., Tosi I., Solanky S., Ainali C., Catak Z., Sreeneebus H., Saklatvala J., Dand N., de Rinaldis E., Chapman A., Nestle F.O., Barnes M.R., Warren R.B., Reynolds N.J., Griffiths C.E.M., Barker J.N., Smith C.H., di Meglio P.; PSORT Consortium. Enhanced NF-κB signaling in type-2 dendritic cells at baseline predicts non-response to adalimumab in psoriasis. *Nat. Commun.*, 2021, Vol. 12, no. 1, 4741. doi: 10.1038/s41467-021-25066-9.
5. Angajala A., Lim S., Phillips J.B., Kim J.H., Yates C., You Z., Tan M. Diverse Roles of Mitochondria in Immune Responses: Novel Insights Into Immuno-Metabolism. *Front. Immunol.*, 2018, Vol. 9, 1605. doi: 10.3389/fimmu.2018.01605.
6. Chen X., Sunkel B., Wang M., Kang S., Wang T., Gnanaprakasam J.N.R., Liu L., Cassel T.A., Scott D.A., Muñoz-Cabello A.M., Lopez-Barneo J., Yang J., Lane A.N., Xin G., Stanton B.Z., Fan T.W., Wang R. Succinate dehydrogenase/complex II is critical for metabolic and epigenetic regulation of T cell proliferation and inflammation. *Sci. Immunol.*, 2022, Vol. 7, no. 70, eabm8161. doi: 10.1126/sciimmunol.abm8161.
7. Conrad N., Misra S., Verbakel J.Y., Verbeke G., Molenberghs G., Taylor P.N., Mason J., Sattar N., McMurray J.J.V., McInnes I.B., Khunti K., Cambridge G. Incidence, prevalence, and co-occurrence of autoimmune disorders over time and by age, sex, and socioeconomic status: a population-based cohort study of 22 million individuals in the UK. *Lancet*, 2023, Vol. 401, no. 10391, pp. 1878-1890.
8. Iacobazzi D., Convertini P., Todisco S., Santarsiero A., Iacobazzi V., Infantino V. New insights into NF-κB signaling in innate immunity: focus on immunometabolic crosstalks. *Biology (Basel)*, 2023, Vol. 12, no. 6, 776. doi: 10.3390/biology12060776.
9. Kedia-Mehta N., Finlay D.K. Competition for nutrients and its role in controlling immune responses. *Nat. Commun.*, 2019, Vol. 10, no. 1, 2123. doi: 10.1038/s41467-019-10015-4.
10. Ma R., Ji T., Zhang H., Dong W., Chen X., Xu P., Chen D., Liang X., Yin X., Liu Y., Ma J., Tang K., Zhang Y., Peng Y., Lu J., Zhang Y., Qin X., Cao X., Wan Y., Huang B. A Pck1-directed glycogen metabolic program regulates formation and maintenance of memory CD8⁺ T cells. *Nat. Cell Biol.*, 2018, Vol. 20, no. 1, pp. 21-27.
11. Pucino V., Guma M. Editorial: The role of immunometabolism in autoimmune mediated and autoinflammatory disorders. *Front. Immunol.*, 2022, Vol. 13, 969939. doi: 10.3389/fimmu.2022.969939.
12. Rothschild D.E., McDaniel D.K., Ringel-Scaia V.M., Allen I.C. Modulating inflammation through the negative regulation of NF-κB signaling. *J. Leukoc. Biol.*, 2018, 10.1002/JLB.3MIR0817-346RRR. doi:10.1002/JLB.3MIR0817-346RRR.
13. Sharfe N., Dalal I., Naghdi Z., Lefaudeux D., Vong L., Dadi H., Navarro H., Tasher D., Ovadia A., Zangen T., Ater D., Ngan B., Hoffmann A., Roifman C.M. NFκB pathway dysregulation due to reduced RelB expression leads to severe autoimmune disorders and declining immunity. *J. Autoimmun.*, 2023, Vol. 137, 102946. doi:10.1016/j.jaut.2022.102946.
14. Sun S.C., Chang J.H., Jin J. Regulation of nuclear factor-κB in autoimmunity. *Trends Immunol.*, 2013, Vol. 34, no. 6, pp. 282-289.
15. van den Bossche J., Horng T., Ryan D.G. Immunometabolism at the basis of health and disease; an editorial. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.*, 2023, Vol. 1869, no. 6, 166715. doi: 10.1016/j.bbdis.2023.166715.

Авторы:

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

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

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

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

Мовсисян Г.Б. — к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории редких наследственных болезней, врач-гастроэнтеролог гастроэнтерологического отделения с гепатологической группой ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Потапов А.С. — д.м.н., профессор, главный научный сотрудник лаборатории научных основ детской гастроэнтерологии и гепатологии, заведующий гастроэнтерологическим отделением с гепатологической группой ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения РФ; профессор кафедры педиатрии и детской ревматологии ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ (Сеченовский университет), Москва, Россия

Мурашкин Н.Н. — д.м.н., заведующий отделением дерматологии с группой лазерной хирургии, заведующий лабораторией патологии кожи у детей отдела научных исследований в педиатрии ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения РФ; профессор кафедры дерматовенерологии и косметологии ФГБУ ДПО «Центральная государственная медицинская академия» Управления делами Президента; профессор кафедры педиатрии и детской ревматологии ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ (Сеченовский университет), Москва, Россия

Абдуллаева Л.М. — младший научный сотрудник лаборатории редких наследственных болезней у детей Медико-генетического центра, врач-невролог отделения психоневрологии и психосоматической патологии ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Фисенко А.П. — д.м.н., профессор, директор ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Authors:

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

Radygina T.V., PhD (Medicine), Senior Research Associate, Laboratory of Experimental Immunology and Virology, National Medical Research Center for Children's Health, Moscow, Russian Federation

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

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

Movsisyan G.B., PhD (Medicine), Senior Research Associate, Laboratory of Rare Hereditary Diseases, Gastroenterologist of the Gastroenterology Department with the Hepatological Group, National Medical Research Center for Children's Health, Moscow, Russian Federation

Potapov A.S., PhD, MD (Medicine), Professor, Chief Scientist, Laboratory of Scientific Foundations of Pediatric Gastroenterology and Hepatology, Head, Gastroenterology Department with Hepatology Group, National Medical Research Center for Children's Health; Professor, Department of Pediatrics and Pediatric Rheumatology, I. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation

Murashkin N.N., PhD, MD (Medicine), Head, Department of Dermatology with the Laser Surgery Group, Head of the Laboratory of Skin Pathology in Children at the Department of Pediatric Research, National Medical Research Center for Children's Health; Professor, Department of Dermatovenerology and Cosmetology, Central State Medical Academy of Department of Presidential Affairs; Professor, Department of Pediatrics and Pediatric Rheumatology, I. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation

Abdullaeva L.M., Junior Research Associate, Laboratory of Rare Hereditary Diseases in Children of the Medical Genetic Center; Neurologist, Department of Psychoneurology and Psychosomatic Pathology, National Medical Research Center for Children's Health, Moscow, Russia

Fisenko A.P., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, National Medical Research Center for Children's Health, Moscow, Russian Federation

МИТОХОНДРИАЛЬНАЯ ДИСФУНКЦИЯ КАК ВЕРОЯТНЫЙ МЕХАНИЗМ ЗАПУСКА ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ СУСТАВОВ

Гончаров А.Г.¹, Татаркина М.А.¹, Лобанова В.В.¹, Козенков И.И.¹,
Джигкаев А.Х.², Гунбин К.В.¹

¹ ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта», г. Калининград, Россия

² ФГБУ «Федеральный центр высоких медицинских технологий» Министерства здравоохранения РФ,
г. Калининград, Россия

Резюме. В статье анализируется вклад митохондриальной дисфункции в развитие воспалительных заболеваний суставов. Митохондрии являются основными поставщиками аденозинтрифосфата (АТФ), побочным продуктом этого производства являются активные формы кислорода (АФК). Митохондрии также обладают эффективным антиоксидантным механизмом, существует определенный баланс между образованием АФК и их нейтрализацией. Накопление с возрастом мутаций (однонуклеотидных замещений – трансверсий и транзиций, а также делеций) в митохондриальной ДНК, расстройство процесса избирательного разрушения (утилизации) поврежденных и дисфункциональных митохондрий – митофагии приводят к нарушению баланса между образованием АФК и их нейтрализацией. Триггерами этого процесса выступают как внутренние факторы – перепроизводство АФК, так и внешние (в ответ на повреждение / травму и инфекцию). В конечном итоге, отказ механизмов контроля качества в результате нарушения процессов митофагии приводит к существенному увеличению неизлечимо поврежденных митохондрий, которые становятся угрозой для выживания клеток. Высокий уровень делеций, накапливающийся с возрастом в генетическом аппарате митохондрий, вызывает усиленное образование АФК, которые, в свою очередь, являются одним из ведущих активаторов цитозольного NLRP3 белка, основного компонента одноименного типа инфламмасом. Усиление формирования инфламмасом, в конечном итоге, запускает каспаз-1 зависимую продукцию провоспалительных интерлейкинов-1 β (IL-1 β) и 18 (IL-18). Неполноценное удаление поврежденных митохондрий приводит к гиперактивации воспалительных сигнальных путей и впоследствии к хроническому системному воспалению и развитию воспалительных заболеваний, в том числе первичных остеоартритов (ОА). Для оценки уровня митохондриальной дисфункции мы оценивали количество копий митохондриального генома в постмитотических клетках мышечной ткани у 48 пациентов в возрасте от 45 до 95 лет у которых был установлен диагноз ОА коленного или тазобедренного суставов. В результате нашего исследования были обнаружены и подтверждены закономерности в правилах мутирования мтДНК человека, соответствующие таковым у позвоночных и, в частности, у млеко-

Адрес для переписки:

Гончаров Андрей Геннадьевич
ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет
имени Иммануила Канта»
236010, Россия, г. Калининград, пр. Победы, 189, кв. 15.
Тел.: 8 (911) 865-20-66.
E-mail: agoncharov59@mail.ru

Address for correspondence:

Andrey G. Goncharov
Immanuel Kant Baltic Federal University
189 Pobedy Ave, Apt 15
Kaliningrad
236010 Russian Federation
Phone: +7 (911) 865-20-66.
E-mail: agoncharov59@mail.ru

Образец цитирования:

А.Г. Гончаров, М.А. Татаркина, В.В. Лобанова,
И.И. Козенков, А.Х. Джигкаев, К.В. Гунбин
«Митохондриальная дисфункция как вероятный
механизм запуска воспалительных заболеваний
суставов» // Российский иммунологический журнал,
2023. Т. 26, № 4. С. 501-506.
doi: 10.46235/1028-7221-13991-MDA

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

For citation:

A.G. Goncharov, M.A. Tatarkina, V.V. Lobanova,
I.I. Kozenkov, A.Kh. Dzbigkaev, K.V. Gunbin "Mitochondrial
dysfunction as a probable mechanism for triggering
inflammatory joint diseases", Russian Journal of Immunology/
Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2023, Vol. 26, no. 4,
pp. 501-506. doi: 10.46235/1028-7221-13991-MDA

© Goncharov A.G. et al., 2023
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.46235/1028-7221-13991-MDA

питающих. Были построены вырожденные (без разделения мутаций по цепям мтДНК и контекста окружающих нуклеотидов) мутационные спектры для всей выборки мтДНК в целом и для каждого индивидуального образца. Продемонстрировано превышение критического порога гетероплазии мтДНК в трети образцов мышечной ткани, при котором доминантным становится патологический фенотип с заметными биохимическими отклонениями в функционировании системы окислительного фосфорилирования (ОХРНОС). Можно отметить, что показатели гетероплазии ниже у пожилых пациентов, которые в течение своей жизни вели значимую физическую активность (занятия спортом, умеренная физическая работа и т. д.) и гетероплазия показывает обратную корреляцию с высокой копийностью мтДНК. Полученные результаты могут быть использованы для диагностики патологий старческого возраста и процесса здорового старения.

Ключевые слова: митохондриальная дисфункция, окислительный стресс, воспаление, остеоартрит, иммуностарение

MITOCHONDRIAL DYSFUNCTION AS A PROBABLE MECHANISM FOR TRIGGERING INFLAMMATORY JOINT DISEASES

Goncharov A.G.^a, Tatarkina M.A.^a, Lobanova V.V.^a, Kozenkov I.I.^a,
Dzhigkaev A.Kh.^b, Gunbin K.V.^a

^a Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation

^b Center for High Medical Technologies, Kaliningrad, Russian Federation

Abstract. The article concerns the contribution of mitochondrial dysfunction to the development of inflammatory joint diseases. Mitochondria are the main suppliers of adenosine triphosphate (ATP). Reactive oxygen species (ROS) are a by-product of this metabolic process. Mitochondria also have an effective antioxidant mechanism: there is a certain balance between the ROS formation and their inactivation. Accumulation with age of mutations (single nucleotide substitutions, e.g., transversions, transitions, and deletions) in mitochondrial DNA, may cause a disorder in selective destruction (utilization) of damaged and dysfunctional mitochondria (mitophagy) thus leading to imbalance between the ROS production and their neutralization. This process is triggered by both internal factors (ROS overproduction) and external factors, i.e., tissue damage / injury and infection. The failure of quality control mechanisms resulting from disruption of mitophagy leads to a significant increase in terminally damaged mitochondria, which become a threat to cell survival. High level of genetic mutations accumulating with age in mitochondrial genome causes an increased formation of ROS, which, in turn, are one of the leading activators of the cytosolic NLRP3 protein, the main component of inflammasome type of the same name. Increased inflammasome formation ultimately triggers caspase-1 dependent production of pro-inflammatory interleukins-1 β (IL-1 β) and 18 (IL-18). Inadequate removal of damaged mitochondria leads to hyperactivation of inflammatory signaling pathways and, subsequently, to chronic systemic inflammation and development of inflammatory diseases, including primary osteoarthritis (OA). To assess the level of mitochondrial dysfunction, we assessed the numbers of mitochondrial genome copies in post-mitotic muscle cells in 48 patients aged 45 to 95 years who were diagnosed with OA of the knee or hip joints. As a result of our study, we have discovered and confirmed some regularities of human mtDNA mutations corresponding to those in vertebrates, and, in particular, in mammals. Degenerate mutation spectra (without classification of mutations by mtDNA chains and the context of surrounding nucleotides) were constructed for mtDNA in general, and for each individual sample. It was demonstrated that, in one-third of muscle samples, the critical threshold of mtDNA heteroplasmy was exceeded, at which the aberrant biochemical phenotype, in terms of oxidative phosphorylation functioning, (OXPHOS) becomes dominant. Of note, the heteroplasmy rates are lower in older patients who have had significant physical activity during their lives (sports, moderate physical work, etc.). Moreover, the heteroplasmy showed an inverse correlation with high mtDNA copy number. The results obtained can be used to diagnose pathologies in elderly, and the process of healthy aging.

Keywords: mitochondrial dysfunction, oxidative stress, inflammation, osteoarthritis, immunoaging

Исследование выполнено за счет средств гранта Российского научного фонда (проект № 21-75-20145).

Введение

Остеоартриты (ОА) включают в себя разнородную группу заболеваний различной этиологии, но объединенных по сходным клиническим проявлениям, морфологической картине. Для каждой из нозологических единиц этой группы характерно поражение всех элементов сустава. В первую очередь поражается суставной хрящ, с последующим вовлечением в патологический процесс субхондральной кости, менисков, синовиальной оболочки, связок, суставной капсулы, околосуставных мышц. Воспалительные и дегенеративные изменения в суставе проявляющиеся болью приводят к существенному нарушению функции сустава и являются наиболее частой причиной инвалидизации лиц пожилого возраста. Значительный рост заболеваемости остеоартрозами ОА, отмеченный ряде масштабных эпидемиологических исследований, ставит перед специалистами вопросы об изучении молекулярных механизмов патогенеза этого заболевания и, соответственно, поиске новых подходов к его профилактике и лечению. Среди заболеваний, поражающих суставы, наибольший удельный вес составляют поражения тазобедренных и коленных суставов. В многочисленных исследованиях отмечается значимый рост заболеваемости первичными остеоартритами, сопряженными с увеличением возраста. Если клинические проявления гоноартроза или коксоартроза в 40-летнем возрасте отмечаются у 10-15-20% лиц в популяции, то в возрасте 65+ они диагностируются уже у 40-50%, а в возрастной категории 85 и старше заболевание отмечается у 85-90% людей старческого возраста [3]. Таким образом, ОА наряду с остеопорозом в настоящее время рассматривается как возраст-ассоциированная патология. В основе патогенеза ОА лежит хроническое, ассоциированное с возрастом воспаление, приводящее к накоплению повреждений в органах и тканях [2]. К основным факторам формирования провоспалительного статуса у пожилых людей, по мнению Franceschi С. и соавт. (2000), можно отнести хроническую стимуляцию иммунной системы вирусами, измененной микробиотой, эндогенными молекулами опасности (DAMP), накоплением сенесцентных клеток и жировой ткани, продуктами оксидативного стресса и связанным с этим процессом активацией механизмов формирования инфламасом [9]. Оксидативный стресс явля-

ется неперенным проявлением митохондриальной дисфункции.

Цель исследования – учитывая ведущую роль митохондриальной дисфункции в развитии и формировании оксидативного стресса, нам представлялось интересным оценить (изучить) уровень митохондриальной гетероплазии мышечной ткани у лиц с ОА коленных и тазобедренных суставов.

Материалы и методы

Для оценки уровня митохондриальной дисфункции мы оценивали количество копий митохондриального генома в постмитотических клетках мышечной ткани. Гетероплазмия относится к состоянию, при котором в клетке присутствует более одного варианта мтДНК [5]. Существует биохимический порог, связанный с процентным содержанием мутантной мтДНК, который необходимо превзойти для снижения функции окислительного фосфорилирования (OXPHOS) и начала проявления патогенного фенотипа [8]. Этот порог может различаться для разных мутаций, например, распространенные точечные мутации m.3243AG и m.8344AG, вызывающие заболевание в мтДНК, обычно должны достигать мутационной нагрузки 80-90%, прежде чем функция OXPHOS будет нарушена [14], в то время как крупномасштабные делеции мтДНК обычно связаны с пороговым уровнем приблизительно 60% [11]. С целью выявления связи между митохондриальными соматическими мутациями (однонуклеотидными заменами и инделами) и ОА нами изучено 48 образцов мышечной ткани, полученных от пациентов обоего пола, проходивших хирургическое лечение по поводу ОА коленного или тазобедренного суставов (возрастной интервал от 45 до 92 лет). Биоптат мышечной ткани в объеме от 20 до 50 кубических миллиметров получали в ходе проведения операции по эндопротезированию суставов. Получение биопсийного материала проводилось с соблюдением всех биоэтических норм и правил: наличие информированного согласия пациентов, заключения независимых локальных этических комитетов ФГАОУ ВО БФУ им. И. Канта и ФГБУ «ФЦВМТ» МЗ РФ.

Анализ генетического материала

Проведен анализ детерминант соматической митохондриальной гетероплазии в постмитотических тканях. Для определения гетероплазии мтДНК и выявления de-novo мутаций был использован подход, аналогичный описанному в работе В. Arbeithuber [4]. Для обогащения получаемых фракций митохондрий, мы адаптиро-

вали методику В. Arbeithuber, в результате нам удалось из 80–100 мг соединительной и мышечной ткани получать до 500 нг мтДНК, свободной от фрагментов ядерного генома и примесей РНК. Оценка степени чистоты фракций мтДНК от примесей ядерного генома была проведена по адаптированной методике ПЦР-скрининга по участку гена бета-актина и AluSx-повторам в человеческом геноме. Кроме того, была разработана и применена методика нормирования количества геномного материала в образцах, которые в дальнейшем использовались для подготовки библиотек для секвенирования на NGS-платформах. В качестве внутреннего контроля уровня гетероплазмии мтДНК были использованы образцы мышечной ткани пациентов, для которых выделялась тотальная ДНК. В дальнейшем для этих образцов методом ПЦР в реальном времени определялась копияность яДНК и мтДНК и сравнивалось их количественное соотношение.

Результаты и обсуждение

Митохондрии являются основными поставщиками аденозинтрифосфата (АТФ), побочным продуктом этого производства являются активные формы кислорода (АФК). Однако митохондрии также обладают очень эффективным антиоксидантным механизмом. Он состоит из супероксиддисмутазы, которая превращает супероксидные радикалы в перекись водорода, которая затем превращается в воду ферментом глутатионпероксидазой в присутствии восстановленного глутатиона [6]. Т. е. существует определенный баланс между образованием АФК и их нейтрализацией. Однако накопление с возрастом мутаций (однонуклеотидных замещений – трансверсий и транзиций, а также делеций) в митохондриальной ДНК приводит к нарушению этого тонкого механизма. Кроме того, нарушается процесс избирательного разрушения (утилизации) поврежденных и дисфункциональных митохондрий – митофагии. Митофагия – сложный процесс, характеризующийся наличием последовательных стадий: инициация митофагии с мечением выбранных белковых мишеней для разрушения митохондрий, поглощения митохондрий путем слияния с аутофагосомой, и окончательная секвестрация в лизосомах, происходящая путем гидролитического расщепления митохондрий. Триггерами этого процесса выступают как внутренние факторы – перепроизводство АФК, так и внешние (в ответ на повреждение / травму и инфекцию). В конечном итоге отказ механизмов контроля

качества в результате нарушения процессов митофагии приводит к накоплению неизлечимо поврежденных митохондрий, которые становятся угрозой для выживания клеток [13]. Неполноценное удаление поврежденных митохондрий приводит к гиперактивации воспалительных сигнальных путей и впоследствии к хроническому системному воспалению и развитию воспалительных заболеваний [7]. Высокий уровень делеций, накапливающийся с возрастом в генетическом аппарате митохондрий, неизбежно приводит к усиленному образованию активных форм кислорода, которые в свою очередь, как предполагается, являются одним из ведущих активаторов цитозольного NLRP3 белка, основного компонента одноименного типа инфламмосом. Усиление формирования инфламмосом, в конечном итоге, приводит к каспаз-1 зависимой продукции провоспалительных интерлейкинов-1 β (IL-1 β) и -18 (IL-18) [1]. Роль митохондрий в комплексном механизме старения – это ответственность за развитие оксидативного стресса, являющегося одним из основных факторов активации системы врожденного иммунитета, которая в свою очередь приводит к развитию хронического, стерильного воспаления и лежат в основе патогенеза как возрастных изменений, так и болезней пожилого возраста, в том числе ОА [10].

Заключение

В результате нашего исследования были обнаружены и подтверждены закономерности в правилах мутирования мтДНК человека, соответствующие таковым у позвоночных и, в частности, у млекопитающих. Были построены выведенные (без разделения мутаций по цепям мтДНК и контекста окружающих нуклеотидов) мутационные спектры для всей выборки мтДНК в целом и для каждого индивидуального образца. Анализ массива данных гетероплазмии в мтДНК у 48 пациентов с широким фенотипическим описанием (образ жизни, физическая и умственная активность, вид труда – тяжелый, легкий, вредный или стрессовый) показал, что некоторые из маркеров лучше коррелировали с возрастным, а не с патологическим (связанным с заболеваниями), процессом старения. В нашей работе был проведен анализ и подсчитано общее количество однонуклеотидных замен (транзиции и трансверсии) во всех образцах: самыми распространенными мутациями являются комплементарные друг другу замены Т > С (35,04%) и А > G (24,79%), суммарно 59,83% всех нуклеотидных замен. Таким образом, в нашем ис-

следовании продемонстрировано превышение критического порога гетероплазии мтДНК в трети образцов мышечной ткани, при котором доминантным становится патологический фенотип с заметными биохимическими отклонениями в функционировании системы ОХРНOS. Замена А > G типична для мтДНК млекопитающих и связана с окислительным повреждением одноцепочечной ДНК [12]. В недавнем исследовании [15] было показано, что количество мутаций Т > С и А > G увеличивается с возрастом в 3,2 раза. Полученные нами данные позволяют предположить наличие митохондриальной дисфункции из-за гетероплазии, вызванной преимущественно окислительным стрессом, в образцах мышечной ткани, полученных от больных ОА. Возможно, накопление мутаций Т > С и А > G может быть одной из причин старения, а также является маркером старения тканей. Ввиду того, что количество митохондрий и уровень

их гетероплазии в различных тканях имеют существенную вариабельность, в зависимости от энергопотребления, открытым остается вопрос о том можно ли экстраполировать результаты, полученные на мышечной ткани на хрящевую ткань. Кроме того, пока дискуссионным остается вопрос: связанный с митохондриальной дисфункцией окислительный стресс является триггером или участником воспалительных явлений в суставе? Также можно отметить, что показатели гетероплазии ниже у пожилых пациентов, которые в течение своей жизни вели значимую физическую активность (занятия спортом, умеренная физическая работа и т. д.), и гетероплазия показывает обратную корреляцию с высокой копийностью мтДНК. Полученные результаты, возможно, могут быть использованы для диагностики патологий старческого возраста и процесса здорового старения.

Список литературы / References

1. Ганковская Л.В., Артемьева О.В., Намазова-Баранова Л.С., Семенков В.Ф., Свитич О.А., Греченко В.В. Иммунологические аспекты старения и возраст-ассоциированная патология. М.: ПедиатрЪ, 2021. 156 с. [Gankovskaya L.V., Artemyeva O.V., Namazova-Baranova L.S., Semenov V.F., Svitich O.A., Grechenko V.V. Immunological aspects of aging and age-associated pathology]. Moscow: Pediatr, 2021. 156 p.
2. Зоткин Е.Г., Дыдыкина И.С., Лиля А.М. Воспалительная теория старения, возраст-ассоциированные заболевания и остеоартрит // РМЖ, 2020. № 7. С. 33-38. [Zotkin E.G., Dydykina I.S., Lila A.M. Inflammatory theory of aging, age-related diseases and osteoarthritis. breast cancer. *RMZh = Russian Medical Journal*, 2020, no. 7, pp. 33-38. (In Russ.)]
3. Allen K.D., Thoma L.M., Golightly Y.M. Epidemiology of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*, 2022, Vol. 30, no. 2, pp. 184-195.
4. Arbeithuber B., Hester J., Cremona M.A., Stoler N., Zaidi A., Higgins B., Anthony K., Chiaromonte F., Diaz F.J., Makova K.D. Age-related accumulation of de novo mitochondrial mutations in mammalian oocytes and somatic tissues. *PLoS Biol.*, 2020, Vol. 18, no. 7, e3000745. doi: 10.1371/journal.pbio.3000745.
5. Bax B.E. Mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy: approaches to diagnosis and treatment. *J. Transl. Genet. Genom.*, 2020, Vol. 4, pp. 1-16.
6. Choubey V., Zeb A., Kaasik A. Molecular mechanisms and regulation of mammalian mitophagy. *Cells*, 2021, Vol. 11, no. 1, 38. doi: 10.3390/cells11010038.
7. Dabravolski S.A., Nikiforov N.G., Zhuravlev A.D., Orekhov N.A., Grechko A.V., Orekhov A.N. Role of the mtDNA mutations and mitophagy in inflammaging. *Int. J. Mol. Sci.*, 2022, Vol. 23, no. 3, 1323. doi: 10.3390/ijms23031323.
8. Fang T., Wang M., Xiao H., Wei X. Mitochondrial dysfunction and chronic lung disease. *Cell Biol. Toxicol.*, 2019, Vol. 35, no. 6, pp. 493-502.
9. Franceschi C., Bonafè M., Valensin S., Olivieri F., de Luca M., Ottaviani E., De Benedictis G. Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 2000, Vol. 908, pp. 244-254.
10. Jang J.Y., Blum A., Liu J., Finkel T. The role of mitochondria in aging. *J. Clin. Invest.*, 2018, Vol. 128, no. 9, pp. 3662-3670.
11. Meyers D.E., Basha H.I., Koenig M.K. Mitochondrial cardiomyopathy: pathophysiology, diagnosis, and management. *Tex. Heart Inst. J.*, 2013, Vol. 40, no. 4, pp. 385-394.
12. Mikhailova A.G., Mikhailova A.A., Ushakova K., Tretiakov E.O., Iliushchenko D., Shamansky V., Lobanova V., Kozenkov I., Efimenko B., Yurchenko A.A., Kozenkova E., Zdobnov E.M., Makeev V., Yurov V., Tanaka M., Gostimskaya I., Fleischmann Z., Annis S., Franco M., Wasko K., Denisov S., Kunz W.S., Knorre D., Mazunin I., Nikolaev S., Fellay J., Reymond A., Khrapko K., Gunbin K., Popadin K. A mitochondria-specific mutational signature of aging: increased rate of A > G substitutions on the heavy strand. *Nucleic Acids Res.*, 2022, Vol. 50, no. 18, pp. 10264-10277.
13. Prasun P. Mitochondrial dysfunction in metabolic syndrome. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.*, 2020, Vol. 1866, no. 10, 165838. doi: 10.1016/j.bbdis.2020.165838.

14. Ray K. Mitochondrial dysfunction in Crohn's disease. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, 2020, Vol. 17, no. 5, 260. doi: 10.1038/s41575-020-0291-y.
15. Sanchez-Contreras M., Sweetwyne M.T., Tsantilas K.A., Whitson J.A., Campbell M.D., Kohn B.F., Kim H.J., Hipp M.J., Fredrickson J., Nguyen M.M., Hurley J.B., Marcinek D.J., Rabinovitch P.S., Kennedy S.R. The multi-tissue landscape of somatic mtDNA mutations indicates tissue-specific accumulation and removal in aging. *Elife*, 2023, Vol. 12, e83395. doi: 10.7554/eLife.83395.

Авторы:

Гончаров А.Г. — к.м.н., старший научный сотрудник Центра иммунологии и клеточных биотехнологий ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта», г. Калининград, Россия

Татаркина М.А. — лаборант-исследователь Центра геномных исследований ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта», г. Калининград, Россия

Лобанова В.В. — лаборант-исследователь Центра геномных исследований ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта», г. Калининград, Россия

Козенков И.И. — младший научный сотрудник Центра геномных исследований ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта», г. Калининград, Россия

Джигкаев А.Х. — к.м.н., заведующий отделением травматологии и ортопедии ФГБУ «Федеральный центр высоких медицинских технологий» Министерства здравоохранения РФ, г. Калининград, Россия

Гунбин К.В. — к.б.н., старший научный сотрудник Центра геномных исследований ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта», г. Калининград, Россия

Authors:

Goncharov A.G., PhD (Medicine), Senior Research Associate, Center for Immunology and Cellular Biotechnologies, Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation

Tatarkina M.A., Research Laboratory Assistant, Center for Genomic Research, Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation

Lobanova V.V., Research Laboratory Assistant, Center for Genomic Research, Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation

Kozenkov I.I., Junior Research Associate, Center for Genomic Research, Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation

Dzhigkaev A.Kh., PhD (Medicine), Head, Department of Traumatology and Orthopedics, Center for High Medical Technologies, Kaliningrad, Russian Federation

Gunbin K.V., PhD (Biology), Senior Research Associate, Center for Genomic Research, Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation

Поступила 12.07.2023
Принята к печати 14.07.2023

Received 12.07.2023
Accepted 14.07.2023

ЦИТОКИНЫ КАК НЕГОРМОНАЛЬНЫЕ РЕГУЛЯТОРЫ В ПАТОГЕНЕЗЕ ЭНДОКРИНОПАТИЙ

Валикова О.В.^{1,2,3}, Здор В.В.^{1,3}, Сарычев В.А.^{1,4},
Тихонов Я.Н.¹, Борода А.В.⁵

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

² ГБУЗ «Краевая клиническая больница № 2», г. Владивосток, Россия

³ Клиника диабета и эндокринных заболеваний, г. Владивосток, Россия

⁴ ЧУЗ «Клиническая больница “РЖД-Медицина”», г. Владивосток, Россия

⁵ ФГБУН «Национальный научный центр морской биологии имени А.В. Жирмунского» Дальневосточного
отделения Российской академии наук, Россия

Резюме. Цитокины регулируют активность гормональной оси «гипоталамус – гипофиз – надпочечники», воздействуют на щитовидную железу и яичники, но точная их роль в патогенезе эндокринных заболеваний до сих пор находится в процессе изучения. Изменение секреции цитокинов при аутоиммунных заболеваниях щитовидной железы и синдроме поликистозных яичников достаточно известно, но основные иммунологические предикторы тяжести течения эндокринопатий и маркеры для назначения таргетной иммунотерапии до сих пор не определены, что актуализирует поставленную нами цель исследования – изучение роли цитокинов во взаимосвязи с гормонами в патогенезе аутоиммунных и не аутоиммунных эндокринопатий – аутоиммунного тиреоидита (АИТ), болезни Грейвса (БГ), узлового и многоузлового зоба, синдрома поликистозных яичников (СПКЯ).

Обследованы 101 пациент с БГ и 105 пациентов с АИТ, 110 пациенток с СПКЯ; 51 пациент с узловым и многоузловым эутиреоидным зобом и 50 здоровых лиц; их средний возраст составил (34,5±2,9 лет). Проведение исследования одобрено Междисциплинарным этическим комитетом ФГБОУ ВО ТГМУ. Проводилось исследование методом ИФА тиреоидных и половых гормонов, ТТГ, аутоантител к ТПО, рецептору ТТГ, цитокинов в сыворотке крови, фолликулярной жидкости, в культуральной среде (первичная культура кумулюсных клеток) – метод клеточных культур, генетическое исследование методом ПЦР, ультрасонография, для морфологической верификации – инвертированный микроскоп СКХ41 (Olympus) с системой фазового контраста, камера AxioCam5 (Carl Zeiss) с программным обеспечением Zen 2, Blue Edition.

При СПКЯ наиболее существенно были повышены в сыворотке крови пациенток IL-6 и TNF α , было выявлено резкое снижение баланса IFN γ /IL-10 в сыворотке крови и культуре кумулюсных клеток при СПКЯ в сравнении с контролем. Доказано, что значимые изменения в содержании тиреоидных гормонов при БГ и ТТГ при АИТ влияют на гиперпродукцию про- и противовоспалительных цитокинов. Прямые или обратные сильные и умеренные связи обнаружены исходно между показателями цитокинов и тиреоидных гормонов при БГ и ТТГ при АИТ. В дальнейшем, по мере коррекции

Адрес для переписки:

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

Address for correspondence:

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

Образец цитирования:

О.В. Валикова, В.В. Здор, В.А. Сарычев, Я.Н. Тихонов,
А.В. Борода «Цитокины как негормональные
регуляторы в патогенезе эндокринопатий»
// Российский иммунологический журнал, 2023. Т. 26,
№ 4. С. 507-514.
doi: 10.46235/1028-7221-13959-CAN

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

For citation:

O.V. Valikova, V.V. Zdor, V.A. Sarychev, Ya.N. Tikhonov,
A.V. Boroda “Cytokines as non-hormonal regulators in
the pathogenesis of endocrinopathies”, *Russian Journal
of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal*, 2023,
Vol. 26, no. 4, pp. 507-514.
doi: 10.46235/1028-7221-13959-CAN

© Valikova O.V. et al., 2023
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.46235/1028-7221-13959-CAN

гормональных нарушений, данные связи ослабевали или вообще не фиксировались. У пациентов с узловым и многоузловым эутиреоидным зобом значимо высоким оказался только уровень $IFN\gamma$, который двукратно превышал значения контрольной группы.

Значимый дисбаланс в соотношении Th1/Th2-маркерных цитокинов и их гиперпродукция при аутоиммунных заболеваниях ЩЖ позволил охарактеризовать систему клеточного реагирования при аутоиммунных тиреопатиях как высоко активную и прямо сопряженную с тиреоидной дисфункцией, выполняющую свою эффекторную функцию на фоне нарушенных иммунорегуляторных механизмов. Выявленные изменения в провоспалительных цитокинах при синдроме поликистозных яичников представляют новые иммунологические маркеры фертильности, что может явиться перспективной мишенью для патогенетической иммунотерапии.

Ключевые слова: цитокины, аутоиммунные тиреопатии, узловой эутиреоидный зоб, синдром поликистозных яичников, ожирение, патогенез

CYTOKINES AS NON-HORMONAL REGULATORS IN THE PATHOGENESIS OF ENDOCRINOPATHIES

Valikova O.V.^{a, b, c}, Zdor V.V.^{a, c}, Sarychev V.A.^{a, d}, Tikhonov Ya.N.^a, Boroda A.V.^e

^a Pacific State Medical University, Vladivostok, Russian Federation

^b Regional Clinical Hospital No. 2 Vladivostok, Russian Federation

^c Clinics for Diabetes and Endocrine Diseases, Vladivostok, Russian Federation

^d Clinical Hospital "RZhD-Medicine", Vladivostok, Russian Federation

^e A. Zhirmunsky National Scientific Center of Marine Biology, Far East Branch, Russian Academy of Sciences, Vladivostok, Russian Federation

Abstract. Cytokines regulate the activity of hypothalamus – pituitary – adrenal hormonal axis, also affecting thyroid gland and ovaries. However, their exact role in pathogenesis of endocrine diseases is still under study. Altered cytokine secretion in autoimmune thyroid diseases and polycystic ovary syndrome is well known. Meanwhile, the main immunological predictors of severe prognosis in endocrinopathies and biomarkers for administration of targeted immunotherapy have not yet been determined. Therefore, our objective was to study the relationships between the cytokines and hormones in pathogenesis of autoimmune and non-autoimmune endocrinopathies, i.e., autoimmune thyroiditis (AIT), Graves' disease (GD), nodular and multinodular goiter, polycystic ovary syndrome (PCOS).

101 patients with GD and 105 patients with AIT, 110 patients with PCOS were examined; 51 patients with nodular and multinodular euthyroid goiter and 50 healthy individuals; their average age was 34.5 ± 2.9 years old. The study was approved by the Interdisciplinary Ethics Committee of the Pacific State Medical University. Clinical examination included ultrasonography. ELISA technique was applied for determination of thyroid and sex hormones, TSH, autoantibodies to TPO, TSH receptor, cytokines in blood serum, in follicular fluid samples, cell culture media (primary cultures of cumulus cells). Genetic studies were carried out with PCR. Morphological verification was performed by inverted microscopy CKX41 (Olympus) with a phase contrast system, camera AxioCam5 (Carl Zeiss) with software Zen 2, Blue Edition.

IL-6 and $TNF\alpha$ in the blood serum of patients with PCOS were most significantly increased, Sharply decreased $IFN\gamma/IL-10$ ratio in blood serum and cumulus cell culture was found in PCOS when compared with controls. Significant changes in the content of thyroid hormones in GD and TSH in AIT have been proven to affect the hyperproduction of pro- and anti-inflammatory cytokines. Before treatment, the direct or reverse correlations were found between the levels of cytokines and thyroid hormones in GD, and TSH in AIT. Subsequently, upon correction of hormonal disorders, these associations became weaker, or faded away. In patients with nodular and multinodular euthyroid goiter, only the $IFN\gamma$ level was significantly increased, being twice as high as in the control group.

A significant imbalance in the ratio of Th1/Th2 marker cytokines and their hyperproduction in autoimmune thyroid diseases made it possible to characterize the cellular response system in autoimmune thyroid disorders as highly active and directly associated with thyroid dysfunction, performing its effector function under the impaired immunoregulation. The revealed changes in pro-inflammatory cytokines in polycystic ovary syndrome represent new immunological markers of fertility, which may be a promising target for pathogenetic immunotherapy.

Keywords: cytokines, autoimmune thyroid disease, Grave's disease, nodular euthyroid goiter, polycystic ovary syndrome, obesity, pathogenesis

Введение

Цитокины регулируют активность гормональной оси «гипоталамус – гипофиз – надпочечники», воздействуя на гипоталамус, усиливают синтез либеринов, повышает выработку гормонов гипофиза, в том числе и тиреотропина (ТТГ) [8]. ТТГ, в свою очередь, влияет непосредственно на тиреоциты щитовидной железы и иммунocyты, так как рецепторы к нему имеются практически на всех клетках иммунной системы. Отношения между гипоталамо-гипофизарно-щитовидной осью и ожирением также сложны и включают различные гормонально-цитокиновые взаимодействия [12].

О взаимосвязи иммунных и эндокринных нарушений при патологии щитовидной железы (ЩЖ), ожирении и других эндокринопатиях свидетельствуют данные о том, что избыток цитокинов и гормонов жировой ткани может инициировать липотоксичность и воспалительный процесс в ЩЖ и других железах внутренней секреции, а лептин играет роль в канцерогенезе ЩЖ, стимулируя рост и инвазию опухолевых клеток [14], изменение секреции адипокинов и цитокинов при абдоминальном ожирении значимо влияет на функцию ЩЖ [1, 12]. Гормоны щитовидной железы (ТГ) и ТТГ, в свою очередь, влияют на массу и функцию жировой ткани в организме человека [5, 12]. В адипоцитах, экспрессирующих рецептор ТТГ, тиреотропин стимулирует секрецию не только лептина, но и IL-6, TNF α , моноцитарный хемоаттрактантный белок-1 (MCP-1), что может играть негативную роль при синдроме поликистозных яичников в сочетании с тиреоидной патологией и ожирением [7, 14]. Более того, исследования *in vivo* и *in vitro* показали, что высвобождение IL-6 из дифференцированных адипоцитов активируется ТТГ, а значительные повышенные концентрации IL-6, CRP, MCP-1 были обнаружены у субъектов с субклиническим гипотиреозом, более высокие концентрации ТТГ и IL-6 были зафиксированы при метаболическом синдроме [8, 9, 11].

Значение хронического латентного асептического воспаления при синдроме поликистозных яичников (СПКЯ) неоднократно обсуждалось в основе морфофункциональных нарушений фертильности при данной эндокринопатии [4, 7, 10]. Висцеральное ожирение, сопровождающее СПКЯ в 38-88% случаев [7, 10], и избыток андрогенов стимулируют интенсивную дифференцировку преадипоцитов в адипоциты, способствуя дальнейшему прогрессированию ожирения [3, 4]. В исследовании 2021 года при СПКЯ была выявлена прямая связь между повышенным уровнем СРБ, IL-18, TNF α , IL-6 и ферритином [4]. В научных трудах, посвященных изучению роли IL-6 как промотора СРБ в печени, опубликованные

результаты остаются неоднозначными, часть авторов приходит к выводам о незначительном значении IL-6 в патогенезе СПКЯ [4, 7]. Однако на животных моделях СПКЯ выявлено резкое увеличение уровней IL-6 и IL-1 β в крови животных на фоне гиперандрогении, запускающее каскад реакций, приводящих к пироптозной гибели гранулезных клеток яичника, фолликулярной дисфункции и фиброзу интерстициальных клеток яичника [13], что весьма актуализирует изучение системной продукции цитокинов при СПКЯ.

Целью работы явилось изучение роли цитокинов во взаимосвязи с гормонами в патогенезе аутоиммунных и неаутоиммунных эндокринопатий – аутоиммунного тиреоидита, болезни Грейвса, узлового и многоузлового зоба, синдрома поликистозных яичников.

Материалы и методы

Исследование проводилось с 2019 по 2023 гг. на базе Приморской краевой клинической больницы № 1 и № 2; клиник г. Владивостока. Всего обследовано: 101 пациент с болезнью Грейвса и 105 пациентов с АИТ, 110 пациенток с СПКЯ; 51 пациент с узловым и многоузловым эутиреоидным зобом; 50 здоровых лиц составили контрольную группу; средний возраст составил (34,5 \pm 2,9 года). Все участники исследования были сопоставимы по возрасту, полу, без острых и хронических заболеваний, не курящие, не употребляющие каких-либо лекарственных препараты и алкоголь, не беременные, не имели сахарного диабета и другой хронической патологии. Все пациенты и здоровые лица дали письменное согласие на участие в исследовании, которое выполнялось с учетом требований Хельсинкской декларации Всемирной ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» с поправками 2000 г. и «Правилами клинической практики в Российской Федерации», утвержденными Приказом Министерства РФ от 19.06.2003 г. № 266. Проведение исследования одобрено Междисциплинарным этическим комитетом ФГБОУ ВО ТГМУ Минздрава России (протокол № 4, 2019 г. и № 9, 2022 г.). Принцип формирования групп – параллельный, открытый, стратифицированный.

У пациентов с БГ и АИТ, узловыми образованиями ЩЖ исследовали тиреоидные гормоны, ТТГ, антитела к рецептору ТТГ и антитела к тиреопероксидазе, кальцитонин. Пациентки с СПКЯ были разделены на 2 группы: I – женщины с ожирением (ИМТ 30,75 \pm 0,18 кг/м²), II – с СПКЯ и нормальным ИМТ 23,2 \pm 0,3 кг/м², всем исследовали половые и гонадотропные гормоны, ТТГ. Всем пациентам исследовали цитокины в сыворотке крови и при СПКЯ, изучали содержание цитокинов в фолликулярной жидкости

(ФЖ) и культуральной среде – методом ИФА с иммунохемилюминисцентной и электрохемилюминисцентной детекцией. Генетическое исследование проводилось методом ПЦР лаборатория BGG, ультразвукография ЩЖ и трансвагинальное исследование органов малого таза на аппарате LOGIQ S8 датчиком 10 МГц. Метод клеточных культур с ежедневным наблюдением за клетками при помощи инвертированного микроскопа СКХ41 (Olympus, Япония), оснащенного системой фазового контраста. Съемку проводили камерой AxioCam5 (Carl Zeiss, Германия) с помощью лицензионного программного обеспечения Zen 2, Blue Edition (Carl Zeiss).

Результаты и обсуждение

Показатели содержания в крови ЛГ, прогестерона, андростендиона и IL-6, IL-10, IFN γ , TNF α , маркеры ожирения (ИМТ, ОТ) при СПКЯ представлены в таблице 1. Была выявлена умеренной силы прямая связь между степенью ожирения (ИМТ), наличием висцерального жира (ОТ) и содержанием IL-6 в крови ($r_{\text{имт}} = 0,6$; $r_{\text{от}} = 0,5$; $p < 0,05$) и зафиксирована положительная умеренной силы корреляция между ИМТ и содержанием TNF α в крови ($r < 0,5$; $p < 0,05$) при СПКЯ с ожирением. Наиболее значимым из провоспалительных цитокинов при СПКЯ в нашем исследовании получился IL-6 и TNF α (табл. 1, 2). Кроме того, зафиксирована прямая умеренной силы связь между показателем ЛГ и IL-6 ($r = 0,5$; $p < 0,05$) при СПКЯ с абдоминальным ожирением, что, на наш взгляд, связано с прогрессирующим асептического воспаления яичников и во многом объясняет дисбаланс в синтезе эстрогенов и прогестиннов [7]. Были выявлены и другие корреляции, подтверждающие связь СПКЯ и латентного воспаления, прогрессирующие на фоне ожирения [7, 10].

Проведение экспериментальной части исследования на культуре кумулюсных клеток (КК) яичника было необходимо для исключения воздействия коморбидности гинекологических заболеваний с СПКЯ. IL-6 в фолликулярной жидкости при СПКЯ значительно превышал ($16,6 \pm 0,4$ нг/мл, против $6,61 \pm 0,3$ нг/мл; $p < 0,05$) показатель здоровых лиц, что также дополнительно свидетельствует об органном инфламационном его генезе. В культуральной среде КК боль-

Проведение экспериментальной части исследования на культуре кумулюсных клеток (КК) яичника было необходимо для исключения воздействия коморбидности гинекологических заболеваний с СПКЯ. IL-6 в фолликулярной жидкости при СПКЯ значительно превышал ($16,6 \pm 0,4$ нг/мл, против $6,61 \pm 0,3$ нг/мл; $p < 0,05$) показатель здоровых лиц, что также дополнительно свидетельствует об органном инфламационном его генезе. В культуральной среде КК боль-

ТАБЛИЦА 1. ПОКАЗАТЕЛИ СЫВОРОТОЧНОГО УРОВНЯ ГОРМОНОВ, ЦИТОКИНОВ, МАРКЕРОВ ОЖИРЕНИЯ ПРИ СПКЯ И ГРУППЫ КОНТРОЛЯ

TABLE 1. INDICATORS OF SERUM LEVELS OF HORMONES, CYTOKINES, MARKERS OF OBESITY IN PCOS AND CONTROL GROUPS

Наименование показателя Name of the indicator	I группа Group I n = 60	II группа Group II n = 50	Контрольная группа Control group n = 50	Значение p Value p
ИМТ (кг/м²) BMI (kg/m ²)	30,75 \pm 0,18	23,2 \pm 0,3	22,9 \pm 0,2	$p_I < 0,05$; $p_{II} < 0,05$
ОТ (см) WC (cm)	102,8 \pm 0,7	86,7 \pm 0,4	78,6 \pm 0,5	$p_I < 0,05$; $p_{II} < 0,05$
Прогестерон (нг/мл) Progesterone (ng/mL)	6,34 \pm 0,34	6,20 \pm 1,01	25,6 \pm 2,3	$p_I = 0,05$; $p_{II} > 0,05$
Андростендион (нг/мл) Androstenedione (ng/mL)	6,16 \pm 0,21	6,51 \pm 0,16	2,20 \pm 0,12	$p_I > 0,05$; $p_{II} < 0,05$
ЛГ (мМЕ/л) LH (mIU/L)	17,41 \pm 0,81	18,04 \pm 0,74	4,75 \pm 0,20	$p_I = 0,05$; $p_{II} < 0,05$
IL-6 (нг/мл) IL-6 (ng/mL)	11,10 \pm 0,29	8,65 \pm 0,31	0,93 \pm 0,13	$p_I < 0,05$; $p_{II} < 0,05$
IFNγ (нг/мл) IFN γ (ng/mL)	2,26 \pm 0,11	1,71 \pm 0,09	3,70 \pm 0,19	$p_I < 0,05$; $p_{II} > 0,05$
TNFα (нг/мл) TNF α (ng/mL)	6,00 \pm 0,29	3,22 \pm 0,21	2,55 \pm 0,13	$p_I < 0,05$; $p_{II} < 0,05$
IL-10 (нг/мл) IL-10 (ng/mL)	10,00 \pm 0,27	8,12 \pm 0,22	4,41 \pm 0,18	$p_I < 0,05$; $p_{II} < 0,05$

Примечание. p_I , p_{II} – статистическая значимость различий ($p < 0,05$ по t-критерию Стьюдента) между показателями у женщин при СПКЯ и у здоровых лиц.

Note. p_I , p_{II} , statistical significance of differences ($p < 0.05$ according to Student's t-test) between indicators in women with PCOS and in healthy individuals.

ных СПКЯ исходно также зафиксирован значимо высокий уровень IL-6 ($20,4 \pm 0,52$ нг/мл против $6,34 \pm 0,3$ нг/мл в контроле; $p < 0,05$), который на 7-е сутки увеличился (до $45,6 \pm 0,423$ нг/мл), но становился достоверно ниже, чем в культуре здоровых КК ($187,53 \pm 0,65$ нг/мл; $p < 0,05$), в которой исходно было достоверно меньше цитокина, что говорит об активационном истощении клеток кумулюса яичников при СПКЯ.

При СПКЯ в крови выявлено резкое снижение баланса $IFN\gamma/IL-10$ до 0,226 против 1,2 у здоровых женщин. Такой же феномен выявлялся в культуре кумулюсных клеток пациенток с СПКЯ, там зафиксировано значимое снижение баланса $IFN\gamma/IL-10$ до 0,27 против 2,38 у здоровых клеток, что достоверно свидетельствует о дисфункции иммунной системы при СПКЯ и сниженном ее провоспалительном резерве.

У здоровых женщин в 100% случаев возникла беременность после ЭКО, а у пациенток с СПКЯ в 40% случаев при уровне IL-6 $\geq 15,0$ нг/мл в ФЖ – беременность не наступила, у 20% пациенток при IL-6 $\geq 12,0$ нг/мл в ФЖ – беременность прервалась на малых сроках, при IL-6 менее 8,0 нг/мл беременность завершилась родами у всех женщин (40% пациенток с СПКЯ), что, конечно, характеризует цитокин как один из важнейших иммунологических маркеров фертильности при СПКЯ.

Выявлено, кроме того, превалирование гетерозиготного носительства C/G rs1800795 в обеих группах с СПКЯ (табл. 2); в сочетании с ожирением наличие гена ухудшает течение заболевания, способствуя гиперпродукции IL-6 [2, 3]. Гомозиготное патологическое носительство G/G rs1800795 встречается чаще у пациенток с СПКЯ, чем в контроле ($p < 0,05$). Гомозиготное носительство C/C rs1800795 является протективным [2, 3] и достаточно веско аргументирует за включение указанных генетических маркеров при подготовке пациенток с СПКЯ к проведению ЭКО, а при повторных и ранее неудачных попытках ЭКО рекомендуем исследовать их как важные

прогностические предикторы фертильности и, в дальнейшем, для решения вопроса о применении таргетной иммунотерапии СПКЯ.

В нашем исследовании было также доказано, что значимые изменения в содержании тиреоидных гормонов при БГ и ТТГ при АИТ влияют на гиперпродукцию про- и противовоспалительных цитокинов (табл. 3). Прямые или обратные сильные и умеренные связи обнаружены между показателями цитокинов и гормонов в период активной гиперпродукции ТГ при болезни Грейвса (БГ) и ТТГ при аутоиммунном гипотиреозе (АИТ). В дальнейшем, по мере коррекции гормональных нарушений, данные связи ослабевали или вообще не фиксировались, что указывает с одной стороны на значимое участие избыточной активации иммунной системы при аутоиммунной патологии ЩЖ (рис. 1), но с другой стороны, на первичное приоритетное нарушение в синтезе ТГ или ТТГ. Динамическое развитие аутоиммунного заболевания во многом, как известно, зависит от генетически обусловленных механизмов иммунорегуляции активационных процессов [1, 9].

Как при БГ, так и при гипотиреозе на фоне АИТ были значимо повышены цитокины: IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-17, $IFN\gamma$ и $TNF\alpha$ (табл. 3). Кардинальные отличия между двумя аутоиммунными тиреопатиями, как известно, наблюдаются в уровне ТТГ и тиреоидных гормонов. Концентрации IL-6 и IL-17 в сыворотке крови прямо коррелировали ($r = 0,75$; $p < 0,05$) с клиническим исходом БГ. Кроме того, при БГ была обнаружена прямая умеренной силы связь между объемом ЩЖ по данным ультрасонографии и системным уровнем $IFN\gamma$ ($r = 0,56$; $p = 0,029$) и IL-1 α была также умеренная прямая связь ($r = 0,61$; $p < 0,05$), что может дополнительно указывать на гиперпродукцию цитокинов непосредственно активированными тиреоцитами (табл. 3) [15]. Такие данные существуют, но на сегодняшний день они не имеют четкой интерпретации и практического применения в плане патогенетической иммунотерапии тиреотоксикоза.

ТАБЛИЦА 2. ПОКАЗАТЕЛИ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА IL-6 rs1800795 У ПАЦИЕНТОК С СПКЯ И ГРУППОЙ КОНТРОЛЯ

TABLE 2. INDICATORS OF IL-6 GENE POLYMORPHISM rs1800795 IN PATIENTS WITH PCOS AND THE CONTROL GROUP

IL-6 rs1800795	I группа Group I n = 60	II группа Group II n = 50	Контрольная группа Control group n = 50	Значение p Value p
G/G	15 (25%)	12 (24%)	11 (22%)	$p_I < 0,05$; $p_{II} < 0,05$
C/G	35 (58%)	24 (48%)	20 (40%)	$p_I < 0,05$; $p_{II} < 0,05$
C/C	10 (17%)	14 (28%)	19 (38%)	$p_I > 0,05$; $p_{II} < 0,05$

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. As for Table 1.

IL-1 β совместно с IL-6 участвуют в дифференцировке Treg в Th17-клетки. При АИТ баланс Treg/Th17-маркерных цитокинов был достоверно нарушен, что позволяет рекомендовать исследовать IL-1 β в комплексе с ТГ, цитокинами (TNF α , IL-6) и тиреоидными аутоантителами для идентификации популяции активированных иммуноцитов на каждой стадии аутоиммунного воспаления. Содержание IL-6 у пациентов с АИТ и БГ в 10-8 раз превышало значения контроля и коррелировало с тяжестью течения тиреопатий. При БГ и АИТ абсолютные показатели цитокина и его удельный вес практически не отличались, что делает цитокин универсальным маркером при эндокринопатиях, учитывая данные нашего исследования при СПКЯ.

Пациенты с узловым и многоузловым эутиреоидным зобом, верифицированные с помощью тонкоигольной аспирационной биопсии как доброкачественный процесс, согласно классификации Bethesda II категория являлись группой сравнения, они имели нормальные показатели ТТГ, ТГ, кальцитонина, не отличавшиеся от контроля ($p > 0,05$). Значимо высоким оказался у этой когорты эутиреоидных пациентов только уровень IFN γ , который двукратно превышал значения контрольной группы ($27,25 \pm 2,86$ против $12,35 \pm 0,88$ пг/мл, $p < 0,01$), но был значимо ниже показателей в группах с аутоиммунным тиреотоксикозом и гипотиреозом ($p < 0,01$; табл. 3). Показатели IL-10, TNF α , IL-17 в сыворотке крови при

эутиреоидной патологии ЩЖ были сравнимы с группой контроля, в отличие от содержания данных цитокинов при аутоиммунных тиреопатиях (табл. 3).

Доля TNF α при АИТ превышала контрольные значения в 2,7 раза.

При АИТ зафиксирован значимый дисбаланс в соотношении IFN γ /IL-10 – индекс возрастал в полтора раза (1,9 против 1,2) по сравнению с группой контроля; и отличался от БГ, где показатель, наоборот, незначительно снижался до 1,04 (рис. 1). В группе сравнения (узловые тиреопатии) зафиксировано повышение соотношения IFN γ /IL-10 до 1,4; но не настолько значимое, как при АИТ. Учитывая, что IFN γ обладает противовирусными, иммунорегуляторными и противовоспалительными свойствами, влияет на транскрипцию около 30 генов, вызывая различные клеточные реакции, его повышение в крови при узловых эутиреоидных тиреопатиях в абсолютных значениях и доле соотношения цитокинов, сравнимом с аутоиммунными тиреопатиями, позволяет сделать предположение о ведущей роли IFN γ развитии и прогрессировании патологии щитовидной железы.

Кроме того, установленный дисбаланс в продукции ключевых иммунорегуляторных цитокинов может являться перспективной мишенью для лечения и рационального дизайна терапии в случаях осложненного тиреотоксикоза или гипотиреоза, когда необходимо применять большие

ТАБЛИЦА 3. КОНЦЕНТРАЦИЯ СЫВОРОТОЧНЫХ ЦИТОКИНОВ У ЗДОРОВЫХ ЛИЦ И ПРИ АУТОИММУННЫХ ТИРЕОПАТИЯХ ДО КОРРЕКЦИИ ТИРЕОИДНОЙ ДИСФУНКЦИИ, М \pm м

TABLE 3. CONCENTRATION OF SERUM CYTOKINES IN HEALTHY INDIVIDUALS AND IN AUTOIMMUNE THYROID DISORDERS BEFORE CORRECTION OF THYROID DYSFUNCTION, M \pm m

Наименование показателя, пг/мл Name of the indicator, pg/mL	Контингент Contingent		
	Контрольная группа Control group n = 50	Пациенты с БГ Patients with GD n = 101	Пациенты с АИТ Patients with AITD n = 105
IL-1 α	1,61 \pm 0,05	21,18 \pm 4,26**	27,58 \pm 6,99**
IL-1 β	1,37 \pm 0,18	5,12 \pm 1,50**	3,21 \pm 0,29*
IL-6	0,93 \pm 0,13	8,59 \pm 2,70**	10,17 \pm 2,37**
IL-10	10,39 \pm 0,30	69,15 \pm 7,31*** #	39,14 \pm 9,72*
IFN γ	12,35 \pm 0,88	72,39 \pm 6,58**	74,74 \pm 23,20**
TNF α	5,30 \pm 1,29	23,79 \pm 4,71**	42,49 \pm 10,27** #
IL-17	10,13 \pm 2,19	35,73 \pm 5,17**	24,92 \pm 2,65**

Примечание. * – статистическая значимость различий ($p < 0,05$ по t-критерию Стьюдента) между показателями при АИТЩЖ и у здоровых лиц; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$ по t-критерию Стьюдента; # – ($p < 0,05$ по t-критерию Стьюдента) статистическая значимость различий в показателях цитокинов у пациентов с БГ и при АИТ.

Note. *, statistical significance of differences ($p < 0.05$ according to Student's t-test) between indicators in AITD and in healthy individuals; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$ according to Student's t-test; #, ($p < 0.05$ according to Student's t-test) statistical significance of differences in cytokine levels in patients with GD and AITD.

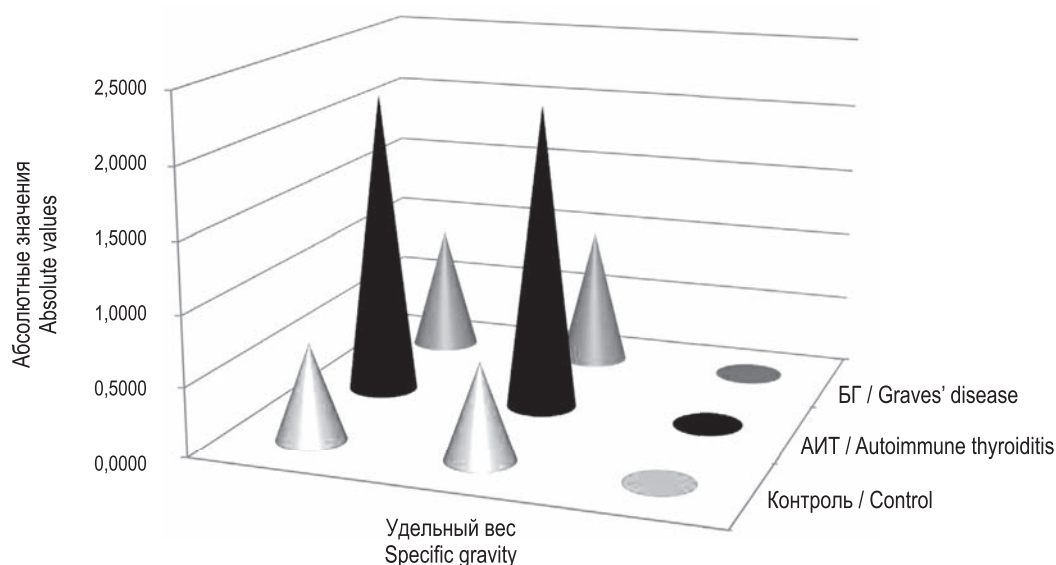


Рисунок 1. Соотношение Th1/Th2-маркерных цитокинов в норме и при аутоиммунных заболеваниях ЩЖ (аутоиммунный тиреоидит, болезнь Грейвса)

Figure 1. Ratio of Th1/Th2 marker cytokines in normal conditions and in autoimmune diseases of the thyroid gland (autoimmune thyroiditis, Graves' disease)

дозы тиамазола, глюкокортикостероидных или тиреоидных гормональных препаратов.

Заключение

Выявленное нарушение баланса про- и противовоспалительных цитокинов при СПКЯ в сочетании с ожирением и наличием гена C/G rs1800795 резко ухудшает течение заболевания, способствуя гиперпродукции IL-6. Полиморфизм гена IL-6 C/G rs1800795 на фоне ожирения позволяет рекомендовать оба маркера для исследования у женщин с неудачными попытками ЭКО, как важный предиктор фертильности и возможная перспектива в применении таргетной иммунотерапии СПКЯ.

Значимое увеличение и существенный дисбаланс в соотношении Th1/Th2-маркерных цитокинов при аутоиммунных заболеваниях ЩЖ

позволил охарактеризовать систему клеточного реагирования при аутоиммунных тиреопатиях как высоко активную и прямо сопряженную с тиреоидной дисфункцией, выполняющую свою эффекторную функцию на фоне нарушенных иммунорегуляторных механизмов. Учитывая, что в «цитокиновой сети» действует принцип избыточности, а взаимодействие и взаимосвязь цитокинов и гормонов проявляется как на уровне их синтеза, так и при реализации ими своих функций, можно утверждать об определяющем, многофакторном и разнонаправленном влиянии цитокинов на течение патологического процесса при аутоиммунных тиреопатиях и синдроме поликистозных яичников. Учитывая наши данные, цитокины и их рецепторы могут служить перспективной мишенью для таргетной иммунотерапии при изученных эндокринопатиях.

Список литературы / References

1. Antunes T.T., Gagnon A., Bell A., Sorisky A. Thyroid-stimulating hormone stimulates interleukin-6 release from 3T3-L1 adipocytes through a cAMP-protein kinase A pathway. *Obes. Res.*, 2005, Vol. 13, no. 12, pp. 2066-2071.
2. Chen L., Zhang Z., Huang J., Jin M. Association between rs1800795 polymorphism in the interleukin-6 gene and the risk of polycystic ovary syndrome: A meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*, 2018, Vol. 97, no. 29, e11558. doi: 10.1097/MD.00000000000011558.
3. de Alencar J.B., Alves H.V., Elpidio L.N., Visentainer J.E., Sell A.M. Polymorphisms of cytokine genes and polycystic ovary syndrome: a review. *Metab. Syndr. Relat. Disord.*, 2016, Vol. 14, no. 10, pp. 468-474.
4. Escobar-Morreale H.F., Carmina E., Dewailly D., Gambineri A., Kelestimur F., Moghetti P., Pugeat M., Qiao J., Wijayarathne C.N., Witchel S.F., Norman R.J. Epidemiology, diagnosis and management of hirsutism: a consensus statement by the androgen excess and polycystic ovary syndrome society. *Hum. Reprod. Update*, 2012, Vol. 18, no. 2, pp. 146-170.
5. Jiang D., Ma S., Jing F., Xu C., Yan F., Wang A., Zhao J. Thyroid-stimulating hormone inhibits adipose triglyceride lipase in 3T3-L1 adipocytes through the PKA pathway. *PLoS One*, 2015, Vol. 10, no. 1, e0116439. doi: 10.1371/journal.pone.0116439.

6. Ma S., Jing F., Xu C., Zhou L., Song Y., Yu C., Jiang D., Gao L., Li Y., Guan Q., Zhao J. Thyrotropin and obesity: increased adipose triglyceride content through glycerol-3-phosphate acyltransferase 3. *Sci. Rep.*, 2015, Vol. 5, 7633. doi: 10.1038/srep07633.
7. Maiorino M.I., Bellastella G., Giugliano D., Esposito K. From inflammation to sexual dysfunctions: a journey through diabetes, obesity, and metabolic syndrome. *J. Endocrinol. Invest.*, 2018, Vol. 41, no. 11, pp. 1249-1258.
8. Mariotti S., Beck-Peccoz P. Physiology of the hypothalamic-pituitary-thyroid axis. 2021 Apr 20. In: Feingold K.R., Anawalt B., Blackman M.R., Boyce A., Chrousos G., Corpas E., de Herder W.W., Dhatariya K., Dungan K., Hofland J., Kalra S., Kaltsas G., Kapoor N., Koch C., Kopp P., Korbonits M., Kovacs C.S., Kuohung W., Laferrère B., Levy M., McGee E.A., McLachlan R., New M., Purnell J., Sahay R., Shah A.S., Singer F., Sperling M.A., Stratakis C.A., Trencle D.L., Wilson D.P., editors. *Endotext* [Internet]. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.; 2000. ID: NBK278958.
9. Mueller S., Kleinau G., Szkudlinski M.W., Jaeschke H., Krause G., Paschke R. The superagonistic activity of bovine thyroid-stimulating hormone (TSH) and the human TR1401 TSH analog is determined by specific amino acids in the hinge region of the human TSH receptor. *J. Biol. Chem.*, 2009, Vol. 284, no. 24, pp. 16317-16324.
10. Rudnicka E., Suchta K., Grymowicz M., Calik-Ksepka A., Smolarczyk K., Duszewska A.M., Smolarczyk R., Meczekalski B. Chronic low grade inflammation in pathogenesis of PCOS. *Int. J. Mol. Sci.*, 2021, Vol. 22, no. 7, 3789. doi: 10.3390/ijms22073789.
11. Siemińska L., Wojciechowska C., Walczak K., Borowski A., Marek B., Nowak M., Kajdaniuk D., Foltyn W., Kos-Kudła B. Associations between metabolic syndrome, serum thyrotropin, and thyroid antibodies status in postmenopausal women, and the role of interleukin-6. *Endokrynol. Pol.*, 2015, Vol. 66, no. 5, pp. 394-403.
12. Walczak K., Sieminska L. Obesity and thyroid axis. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 2021, Vol. 18, no. 18, 9434. doi: 10.3390/ijerph18189434.
13. Wang D., Weng Y., Zhang Y., Wang R., Wang T., Zhou J., Shen S., Wang H., Wang Y. Exposure to hyperandrogen drives ovarian dysfunction and fibrosis by activating the NLRP3 inflammasome in mice. *Sci. Total Environ.*, 2020, Vol. 745, 141049. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.141049.
14. Yang C., He Z., Zhang Q., Lu M., Zhao J., Chen W., Gao L. TSH activates macrophage inflammation by G13- and G15-dependent Pathways. *Endocrinology*, 2021, Vol. 162, no. 8, bqab077. doi: 10.1210/endo/bqab077.
15. Zdor V.V., Geltser B.I., Eliseikina M.G., Markelova E.V., Tikhonov Y.N., Plekhova N.G., Karaulov A.V. Roles of thyroid hormones, mast cells, and inflammatory mediators in the initiation and progression of autoimmune thyroid diseases. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 2020, Vol. 181, no. 9, pp. 715-726.

Авторы:

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

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

Сарычев В.А. — аспирант кафедры нормальной и патологической физиологии ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ; врач-хирург, ЧУЗ «Клиническая больница «РЖД-Медицина», г. Владивосток, Россия

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

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

Authors:

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

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

Sarychev V.A., Postgraduate Student, Department of Normal and Pathological Physiology, Pacific State Medical University; Surgeon, Clinical Hospital "RZhD-Medicine", Vladivostok, Russian Federation

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

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

Поступила 10.07.2023
Принята к печати 12.07.2023

Received 10.07.2023
Accepted 12.07.2023

ЭКСПРЕССИЯ РЕЦЕПТОРА IL-7 НА Th1-, Th17-ЛИМФОЦИТАХ У ПАЦИЕНТОВ С ПСОРИАТИЧЕСКИМ АРТРИТОМ

Блинова Е.А., Ангельская О.А., Козлов В.А.

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт клинической и фундаментальной иммунологии»,
г. Новосибирск, Россия

Резюме. Псориатический артрит (ПсА) – хроническое иммуноопосредованное воспалительное заболевание суставов, позвоночника и энтезисов, которое может наблюдаться у больных с псориазом. Распространенность псориатического артрита высока в России, в последние годы отмечается прирост заболеваемости. В основе патогенеза ПсА лежит активация Th1-, Th17-клеток, продуцируемые клетками провоспалительные цитокины участвуют в каскаде реакций, приводящих к деформации суставов и разрушению костной ткани.

Для некоторых аутоиммунных заболеваний, ассоциированных с Th1/Th17-ответом, обнаружена вовлеченность IL-7 в патогенетические механизмы. В том числе предполагается, что IL-7 может поддерживать аутореактивные Т-лимфоциты. Воздействие цитокина на клетки обеспечивается путем его связывания со своим рецептором, в результате происходит передача сигнала внутрь клетки и запуск процессов дифференцировки, пролиферации, продукции цитокинов. На экспериментальных животных моделях аутоиммунных заболеваний показано, что применение блокирующих антител к α -цепи рецептора IL-7 (IL-7R) приводит к уменьшению воспаления в тканях и снижению числа инфильтрирующих Т-лимфоцитов. Поэтому целью данной работы было исследовать *in vitro* влияние IL-7 и блокады α -цепи рецептора IL-7 на содержание Th1-, Th17-лимфоцитов и экспрессию субъединиц рецептора IL-7 на данных клетках в норме и при псориатическом артрите.

В исследование было включено 9 пациентов с ПсА в стадии обострения основного заболевания (средний возраст $44 \pm 6,5$ года) и 6 условно здоровых доноров (средний возраст $45 \pm 2,7$ лет). Влияние IL-7 и блокирующих моноклональных антител (aCD127) оценивали в культурах МНК периферической крови *in vitro*. Для определения экспрессии субъединиц рецептора IL-7 (CD127, CD132) и фенотипирования клеток периферической крови и культур использовали метод проточной цитофлуориметрии.

Впервые было показано, что у пациентов с ПсА увеличено число CD127⁺CD132⁻ и CD127⁺CD132⁺ клеток среди Th17-лимфоцитов, а также CD127⁺CD132⁻, CD127⁺CD132⁺ и CD127⁻CD132⁺ клеток среди Th1-лимфоцитов, что может говорить об участии IL-7 в поддержании данных клеточных по-

Адрес для переписки:

Блинова Елена Андреевна
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: blinovaelena-85@yandex.ru

Address for correspondence:

Elena A. Blinova
Research Institute of Fundamental
and Clinical Immunology
14 Yadrintsevskaya St
Novosibirsk
630099 Russian Federation
Phone: +7 (383) 227-01-35.
Fax: +7 (383) 222-70-28.
E-mail: blinovaelena-85@yandex.ru

Образец цитирования:

Е.А. Блинова, О.А. Ангельская, В.А. Козлов «Экспрессия
рецептора IL-7 на Th1-, Th17-лимфоцитах
у пациентов с псориатическим артритом»
// Российский иммунологический журнал, 2023. Т. 26,
№ 4. С. 515-520.
doi: 10.46235/1028-7221-13982-EOI
© Блинова Е.А. и соавт., 2023
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

E.A. Blinova, O.A. Angelskaya, V.A. Kozlov "Expression
of IL-7 receptor on Th1, Th17 lymphocytes in patients with
psoriatic arthritis", Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy
Immunologicheskii Zhurnal, 2023, Vol. 26, no. 4, pp. 515-520.
doi: 10.46235/1028-7221-13982-EOI
© Blinova E.A. et al., 2023
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.46235/1028-7221-13982-EOI

пуляций. Под влиянием IL-7 в культуре как у доноров, так и у пациентов происходило увеличение содержания Th1-клеток и снижение числа Th17-клеток, и противоположный эффект наблюдался в условиях блокады IL-7R. Под воздействием IL-7, а также блокирующих антител происходило значимое снижение экспрессии CD127 на Th1-, Th17-лимфоцитах. Однако сокращение числа CD127⁺CD132⁺ среди Th1-, Th17-лимфоцитов происходило только в условиях блокады антителами. Т. е., несмотря на перераспределение Th1- и Th17-лимфоцитов в культуре, в условиях блокады клетки данных популяций не активировались. Полученные данные могут послужить основой для выбора рецептора IL-7 в качестве мишени при разработке таргетных препаратов для лечения ПсА.

Ключевые слова: рецептор IL-7, Th1-лимфоциты, Th17-лимфоциты, блокада α -цепи рецептора IL-7, псориатический артрит

EXPRESSION OF IL-7 RECEPTOR ON Th1, Th17 LYMPHOCYTES IN PATIENTS WITH PSORIATIC ARTHRITIS

Blinova E.A., Angelskaya O.A., Kozlov V.A.

Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Abstract. Psoriatic arthritis (PsA) is a chronic immune-mediated inflammatory disease of the joints, spine, and entheses that can occur in patients with psoriasis. The prevalence of psoriatic arthritis is high in Russia, in recent years there has been an increase in its incidence rates. The pathogenesis of PsA is based on the activation of Th1, Th17 cells. Pro-inflammatory cytokines produced by the cells are involved in the cascade of reactions leading to the joint deformity and bone destruction. For some autoimmune diseases associated with the Th1/Th17 response, IL-7 has been found to be involved in pathogenetic mechanisms. At the same time, IL-7 is assumed to support autoreactive T lymphocytes. Effect of the cytokine on cells is provided by the binding to a specific receptor thus causing a signal transmission into the cell and inducing the processes of differentiation, proliferation, and production of cytokines. In animal models of autoimmune diseases, usage of blocking antibodies to α -chain of the IL-7 receptor (IL-7R) was shown to cause reduced inflammation in target tissues and decreased number of infiltrating T lymphocytes. Therefore, the aim of this work was to investigate the *in vitro* effects of IL-7 and blockade of the α -chain of the IL-7 receptor on the contents of Th1, Th17 lymphocytes and expression of IL-7 receptor subunits on these cells in normal subjects and in psoriatic arthritis. The study included nine patients with PsA in the stage of exacerbation of the underlying disease (mean age 44±6.5 years) and 6 healthy individuals (mean age 45±2.7 years). The *in vitro* effects of IL-7 and specific blocking monoclonal antibodies (aCD127) was evaluated in cultures of mononuclear cells from peripheral blood. Flow cytometry was used to determine the expression of IL-7 receptor subunits (CD127, CD132) and to assess cell phenotypes in peripheral blood and cultured cells. We have shown for the first time that patients with PsA have an increased number of CD127⁺CD132⁻ and CD127⁺CD132⁺ cells among Th17 lymphocytes, as well as CD127⁺CD132⁻, CD127⁺CD132⁺ and CD127⁻CD132⁺ cells among Th1 lymphocytes, which suggests participation of IL-7 in maintaining these cell populations. Upon the *in vitro* supplement of IL-7, an increase in the Th1 cell contents and a decreased number of Th17 cells were observed, both in donors and PsA patients, and the opposite effect was observed under the conditions of IL-7R of blockade. Under the influence of IL-7, as well as with blocking antibodies, there was a significant decrease in CD127 expression on Th1, Th17 lymphocytes. However, a decrease in the number of CD127⁺CD132⁺ among Th1, Th17 lymphocytes occurred only following blockade with antibodies. That is, despite redistribution of Th1 and Th17 lymphocytes in culture, the cells of these populations were not activated under the IL-7 receptor blockade. The obtained data may serve as a basis for choosing the IL-7 receptor as a target in the development of targeted drugs for the treatment of PsA.

Keywords: IL-7 receptor, Th1 lymphocytes, Th17 lymphocytes, blockade of α -chain blockade of IL-7 receptor, psoriatic arthritis

Данная работа выполнена при поддержке Российского научного фонда и правительства Новосибирской области (региональный проект РНФ № 22-25-20212).

Введение

В последние годы отмечается рост псориатическими заболеваниями во всем мире, преимущественно в развитых странах, в том числе и в России. Распространенность псориатического артрита (ПсА) в России варьирует в широком диапазоне от 6 до 42% [1] и зависит от популяции и региона. Патогенетические механизмы развития ПсА до конца не изучены. Установлено, что основную роль в патогенезе играют Th1-, Th17-клетки и продуцируемые ими цитокины IFN γ и IL-17 соответственно [9]. Несмотря на появление биологической терапии в виде ингибиторов основных медиаторов воспаления (TNF, IL-12/23, IL-17), актуальным вопросом в ревматологии, дерматологии остается поиск новых мишеней и подходов к лечению заболевания. Потому что ранняя терапия ПсА, реализующая стратегию «лечения до достижения цели», может замедлить прогрессирование повреждения суставов [8].

Поддержание аутореактивных клеток, в том числе Th1-, Th17-лимфоцитов до конца не расшифровано. В последнее время предполагается, что вклад в поддержание аутореактивных клеток может вносить IL-7, роль которого уже установлена для некоторых аутоиммунных заболеваний [3, 6]. Показано, что IL-7 при отсутствии других факторов/цитокинов способен направлять дифференцировку лимфоцитов в Th1-клетки как у мыши, так и у человека [5].

Действие IL-7 реализуется после его связывания со своим гетеродимерным рецептором, состоящим из двух цепей: α -цепи (CD127) и общей γ -цепи (CD132). Успешность применения блокады α -цепи рецептора IL-7 с помощью моноклональных антител показана на экспериментальных животных моделях аутоиммунных заболеваний [2, 4].

Поэтому целью данной работы было исследовать *in vitro* влияние IL-7 и блокады α -цепи рецептора IL-7 на содержание Th1, Th17-лимфоцитов и экспрессию субъединиц рецептора IL-7 на данных клетках в норме и при псориатическом артрите.

Материалы и методы

В исследование вошли 9 пациентов с псориатическим артритом (ПсА) в стадии обострения (средний возраст $44 \pm 6,5$ года, 7 женщин и 2 муж-

чин) и 6 условно здоровых доноров (средний возраст $45 \pm 2,7$ лет, 5 женщин и 1 мужчина). Пациенты с ПсА получали терапию в ГБУЗ НСО ГБ № 3 (г. Новосибирск), забор крови от пациентов осуществлялся после подписания информированного согласия. Пациенты преимущественно имели легкое и среднетяжелое течение псориаза и выраженный суставной болевой синдром.

Получение клеток периферической крови, культивирование и подготовка клеток для цитометрического анализа

Выделение мононуклеарных клеток (МНК) осуществляли методом центрифугирования в градиенте плотности фиколл-урографина ($\rho = 1,082$ г/л) (BioClot GmbH, Германия).

МНК периферической крови делили на две части. Одну часть МНК культивировали в 48-луночном планшете (BioFil, Китай) в присутствии IL-7 (50 нг/мл; PeproTech, США) и блокирующих антител к α -цепи рецептора IL-7 (10 мкг/мл; BioLegend, США) в течении 7 дней. В качестве контроля использовали клетки без стимуляции.

Вторую часть свежее выделенных МНК, как и клетки после культивирования, окрашивали моноклональными антителами (BioLegend, США) против поверхностных маркеров: CD3-FITC, CD4-PE/Cy7, CD183 (CXCR3)-APC/Cy7, CD161-APC, CD161-PE, CD127-PerCP/Cy5.5, CD132-APC.

Анализ проводили на проточном цитофлуориметре FACS CantoII (Becton Dickinson, США) в программном обеспечении FACS Diva 6.0 (Becton Dickinson, США).

Статистическая обработка

Статистический анализ полученных данных проводили с использованием пакета прикладных программ Statistica 6.0 (StatSoft, США). Поскольку распределение показателей не всегда соответствовало нормальному распределению, согласно критерию Шапиро–Уилка, применялись методы непараметрической статистики. Для сравнения несвязанных переменных использовали критерий Манна–Уитни, для связанных переменных – парный критерий Вилкоксона. Выявленные отличия считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

В соответствии с данными литературы мы выбрали хемикиновый рецептор CXCR3 (CD183) для фенотипирования Th1-клеток и CD161 – для фенотипирования Th17-клеток [10]. По содержанию Th1, Th17-лимфоцитов пациенты с ПсА достоверно не отличались от доноров. Однако у пациентов наблюдались изменения в экспрес-

ТАБЛИЦА 1. СОДЕРЖАНИЕ Th1-, Th17-КЛЕТОК И ЭКСПРЕССИЯ НА НИХ СУБЪЕДИНИЦ IL-7R В ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ЗДОРОВЫХ ИНДИВИДУУМОВ И ПАЦИЕНТОВ С ПСОРИАТИЧЕСКИМ АРТРИТОМ, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 1. CONTENT OF Th1, Th17 CELLS AND EXPRESSION OF IL-7R SUBUNITS ON IT IN THE PERIPHERAL BLOOD OF HEALTHY INDIVIDUALS AND PATIENTS WITH PSORIATIC ARTHRITIS, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

Клеточная субпопуляция, % Cell population, %	Доноры Donors (n = 6)	Пациенты с ПсА Patients with PsA (n = 9)
Th1	9,4 (3,90-14,85)	2,6 (2,0-3,9)
Th1_CD127*132 ⁻	0,4 (0,25-0,75)	5,7 (2,9-9,1)*
Th1_CD127*132 ⁺	0,0 (0,0-0,0)	1,5 (0,2-2,4)*
Th1_CD127 ⁻ 132 ⁺	2,4 (1,85-3,65)	6,8 (4,5-13,9)*
Th17	15,0 (14,1-22,4)	17,8 (13,4-25,8)
Th17_CD127*132 ⁻	0,25 (0,20-0,45)	4,9 (3,4-8,4)*
Th17_CD127*132 ⁺	0,0 (0,0-0,0)	0,3 (0,2-1,0)*
Th17_CD127 ⁻ 132 ⁺	1,7 (1,25-2,00)	2,8 (0,4-4,1)

Примечание. ПсА – псориатический артрит; * – достоверное отличие по сравнению с группой доноров, критерий Манна–Уитни (p < 0,05). За 100% принято число Th1/Th17-клеток. Число Th1/Th17-клеток определяли из гейта CD4⁺ лимфоцитов.

Note. PsA, psoriatic arthritis; *, significant difference compared to donors' group, Mann–Whitney test (p < 0.05). The number of Th1/Th17 cells was taken as 100%. The number of Th1/Th17 cells was determine from CD4⁺ lymphocytes gate.

ТАБЛИЦА 2. СОДЕРЖАНИЕ Th1-, Th17-КЛЕТОК И ЭКСПРЕССИЯ НА НИХ СУБЪЕДИНИЦ IL-7R В КУЛЬТУРАХ IN VITRO В НОРМЕ И ПРИ ПСОРИАТИЧЕСКОМ АРТРИТЕ, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 2. CONTENT OF Th1, Th17 CELLS AND EXPRESSION OF IL-7R SUBUNITS ON IT IN THE CULTURES IN VITRO IN NORM AND PSORIATIC ARTHRITIS, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

Клеточная субпопуляция, % Cell population, %	Доноры Donors (n = 6)			Пациенты с ПсА Patients with PsA (n = 9)		
	k	IL-7	aCD127	k	IL-7	aCD127
Th1	17,4 (15,0-23,4)	24,4 (18,8-32,0) [#]	8,1 (6,5-8,5) ^{# †}	14,0 (7,1-16,9)	30,3 (14,6-61,8) [#]	4,9 (3,7-8,6) ^{# †}
Th1_CD127*132 ⁻	21,85 (16,6-27,1)	1,4 (0,9-1,9) [#]	0,25 (0,2-0,3) ^{# †}	4,9 (4,0-8,8)*	0,2 (0,1-0,9) [#]	0,1 (0,0-0,4) [#]
Th1_CD127*132 ⁺	5,2 (2,8-8,0)	0,15 (0,1-0,6) [#]	0,05 (0,0-0,2) [#]	1,1 (0,6-4,1)*	0,0 (0,0-0,1) [#]	0,1 (0,0-0,2) [#]
Th1_CD127 ⁻ 132 ⁺	17,85 (10,2-20,0)	15,45 (8,1-22,3)	1,55 (0,7-5,1) ^{# †}	15,4 (3,1-26,0)	9,7 (4,5-23,5)	2,7 (1,4-6,9) ^{# †}
Th17	11,4 (9,8-13,4)	7,6 (6,3-8,9) [#]	13,1 (11,3-14,3) ^{# †}	9,1 (5,8-14,0)	5,5 (2,8-9,4) [#]	12,0 (6,9-14,9) [†]
Th17_CD127*132 ⁻	21,3 (17,2-29,8)	3,25 (2,2-5,1) [#]	0,3 (0,2-0,5) ^{# †}	5,9 (3,9-11,9)*	0,5 (0,1-2,7) [#]	0,1 (0,0-1,0) ^{# †}
Th17_CD127*132 ⁺	5,5 (2,8-6,3)	0,15 (0,0-1,2) [#]	0,0 (0,0-0,0) [#]	1,7 (0,7-4,3)*	0,0 (0,0-0,1) [#]	0,0 (0,0-0,0) [#]
Th17_CD127 ⁻ 132 ⁺	9,7 (9,0-11,9)	10,95 (8,3-13,7)	0,4 (0,1-1,4) ^{# †}	8,8 (2,1-18,5)	3,7 (0,9-12,6)	0,5 (0,1-2,5) ^{# †}

Примечание. ПсА – псориатический артрит; k – клетки без стимуляции; IL-7 – клетки, стимулированные IL-7 (50 нг/мл); aCD127 – клетки, обработанные блокирующими антителами против CD127 и стимулированные IL-7; * – достоверное отличие по сравнению с группой доноров, критерий Манна–Уитни (p < 0,05), # – достоверное отличие по сравнению с клетками без стимуляции (k), критерий Вилкоксона (p < 0,05); † – достоверное отличие по сравнению с клетками, стимулированными IL-7, критерий Вилкоксона (p < 0,05).

Note. PsA, psoriatic arthritis; k, cells without stimulation; IL-7, cells, stimulated with IL-7 (50 ng/mL); aCD127, cells, treated with blocking antibodies against CD127 (10 mkg/mL) and stimulated with IL-7; *, significant difference compared to donors' group, Mann–Whitney test (p < 0.05), #, significant difference compared to cells without stimulation (k), Wilcoxon test (p < 0.05); †, significant difference compared to cells, stimulated with IL-7, Wilcoxon test (p < 0.05).

сии субъединиц рецептора IL-7 CD127 и CD132 на Th1-, Th17-лимфоцитах (табл. 1). При ПсА было выявлено увеличение CD127⁺CD132⁻ и CD127⁺CD132⁺ клеток среди Th17-лимфоцитов по сравнению с показателями доноров. Среди Th1-лимфоцитов пациентов с ПсА было обнаружено увеличение всех 3 субпопуляций клеток, экспрессирующих субъединицы рецептора IL-7. Повышенная экспрессия общей γ -цепи на Th1-клетках при ПсА может отражать их активацию и вовлеченность в патогенез заболевания. Так, при диабете I типа было обнаружено увеличение CD4⁺T-лимфоцитов с повышенной экспрессией γ -цепи и α -цепи рецептора IL-7 [7], что, как предполагают авторы, отражается на передаче сигналов с цитокинового рецептора и продукции цитокинов эффекторными клетками.

Под влиянием IL-7 в культуре как у доноров, так и у пациентов происходило увеличение содержания Th1-клеток и снижение числа Th17-клеток (табл. 2). При блокаде рецептора IL-7, напротив, наблюдалось снижение числа Th1-клеток и восстановление численности Th17-клеток до уровня контроля без стимуляции. Известно, что IL-7 участвует в поддержании Th17-клеток и усиливает дифференцировку Th1-клеток [5].

Под воздействием IL-7, а также блокирующих антител происходило значимое снижение экспрессии CD127 на Th1-, Th17-лимфоцитах (табл. 2), что говорит в первом случае о негативной аутокринной регуляции IL-7R, а во втором случае

об эффективности связывания рецептора блокирующими антителами. При этом в условиях блокады значительно сокращалось число CD127⁺CD132⁺ клеток как среди Th1-, так и Th17-лимфоцитов по сравнению с контролем без стимуляции и клетками, стимулированными IL-7. Т. е., несмотря на перераспределение Th1- и Th17-лимфоцитов в культуре, в условиях блокады клетки данных популяций не активировались. Что, учитывая вовлеченность Th1-, Th17-клеток в патогенез ПсА, является положительным результатом.

Заключение

Таким образом, в нашем исследовании впервые было показано, что у пациентов с ПсА увеличена экспрессия CD127 и CD132 на популяциях Th1- и Th17-лимфоцитов периферической крови относительно показателей здоровых индивидуумов. Под воздействием блокирующих α -цепь IL-7R антител снижается число Th1-клеток по сравнению с контролем и клетками, стимулированными IL-7, сохраняется на уровне контроля число Th17-клеток в норме и при ПсА. Кроме того, в условиях блокады практически отсутствует активация Th1- и Th17-лимфоцитов. Полученные данные могут послужить основой для выбора рецептора IL-7 в качестве мишени при разработке таргетных препаратов для лечения псориатического артрита.

Список литературы / References

1. Мишина О.С., Коротаева Т.В., Стародубов В.И., Насонов Е.Л. Заболеваемость псориатическим артритом в России: тенденции на современном этапе и перспективы // Научно-практическая ревматология, 2015. Т. 53, № 3. С. 251-257. [Mishina O.S., Korotaeva T.V., Starodubov V.I., Nasonov E.L. Incidence of psoriatic arthritis in Russia: Trends at the present stage and prospects. *Nauchno-prakticheskaya revmatologiya = Rheumatology Science and Practice*, 2013, Vol. 53, no. 3, pp. 251-257. (In Russ.)]
2. Belarif L., Mary C., Jacquemont L., Mai H.L., Danger R., Hervouet J., Minault D., Thepenier V., Nerrière-Daguin V., Nguyen E., Pengam S., Largy E., Delobel A., Martinet B., Le Bas-Bernardet S., Brouard S., Soullillou J.P., Degauque N., Blancho G., Vanhove B., Poirier N. IL-7 receptor blockade blunts antigen-specific memory T cell responses and chronic inflammation in primates. *Nat. Commun.*, 2018, Vol. 9, no. 1, 4483. doi: 10.1038/s41467-018-06804-y.
3. Dooms H. Interleukin-7: Fuel for the autoimmune attack. *J. Autoimmun.*, 2013, Vol. 45, pp. 40-48.
4. Hartgring S.A., Willis C.R., Alcorn D., Nelson L.J., Bijlsma J.W., Lafeber F.P., van Roon J.A. Blockade of the interleukin-7 receptor inhibits collagen-induced arthritis and is associated with reduction of T cell activity and proinflammatory mediators. *Arthritis Rheum.*, 2010, Vol. 62, no. 9, pp. 2716-2725.
5. Lee L.F., Axtell R., Tu G.H., Logronio K., Dilley J., Yu J., Rickert M., Han B., Evering W., Walker M.G., Shi J., de Jong B.A., Killestein J., Polman C.H., Steinman L., Lin J.C. IL-7 promotes T(H)1 development and serum IL-7 predicts clinical response to interferon- β in multiple sclerosis. *Sci. Transl. Med.*, 2011, Vol. 3, no. 93, 93ra68. doi: 10.1126/scitranslmed.3002400.
6. Meyer A., Parmar P.J., Shahrara S. Significance of IL-7 and IL-7R in RA and autoimmunity. *Autoimmun. Rev.*, 2022, Vol. 21, no. 7, 103120. doi: 10.1016/j.autrev.2022.103120.

7. Seyfarth J., Mütze N., Antony Cruz J., Kummer S., Reinauer C., Mayatepek E., Meissner T., Jacobsen M. CD4⁺ T-cells with high common γ chain expression and disturbed cytokine production are enriched in children with type-1 diabetes. *Front. Immunol.*, 2019, Vol. 10, 820. doi: 10.3389/fimmu.2019.00820.
8. Stober C., Ye W., Guruparan T., Htut E., Clunie G., Jadon D. Prevalence and predictors of tumour necrosis factor inhibitor persistence in psoriatic arthritis. *Rheumatology (Oxford)*, 2018, Vol. 57, no 1, pp. 158-163.
9. Veale D.J., Fearon U. The pathogenesis of psoriatic arthritis. *Lancet*, 2018, Vol. 391, no. 10136, pp. 2273-2284.
10. Wingender G., Kronenberg M. OMIP-030: Characterization of human T cell subsets via surface markers. *Cytometry A*, 2015, Vol. 87, no 12, pp. 1067-1069.

Авторы:

Блинова Е.А. — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории клинической иммунопатологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт клинической и фундаментальной иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Ангельская О.А. — аспирант лаборатории клинической иммунопатологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт клинической и фундаментальной иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Козлов В.А. — д.м.н., профессор, академик РАН, заведующий лабораторией клинической иммунопатологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт клинической и фундаментальной иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Authors:

Blinova E.A., PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Clinical Immunopathology; Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology Novosibirsk, Russian Federation

Angelskaya O.A., Postgraduate Student, Laboratory of Clinical Immunopathology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Kozlov V.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Full Member, Russian Academy of Sciences, Head, Laboratory of Clinical Immunopathology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Поступила 12.07.2023
Принята к печати 14.07.2023

Received 12.07.2023
Accepted 14.07.2023

ОДНОНУКЛЕОТИДНЫЙ ПОЛИМОРФИЗМ ОСТЕОПРОТЕГЕРИНА КАК ВОЗМОЖНЫЙ БИОМАРКЕР РЕВМАТОИДНОГО АРТРИТА В БАШКИРСКОЙ ПОПУЛЯЦИИ ЧЕЛЯБИНСКОЙ ОБЛАСТИ

Чумачёва Ю.В.¹, Сташкевич Д.С.¹, Девальд И.В.¹, Сулова Т.А.^{1,2}

¹ ФГБОУ «Челябинский государственный университет», г. Челябинск, Россия

² ГБУЗ «Челябинская областная станция переливания крови», г. Челябинск, Россия

Резюме. Ревматоидный артрит (РА) — это многофакторное аутоиммунное ревматическое заболевание неизвестной этиологии, характеризующееся хроническим эрозивным артритом (синовитом) и системным поражением внутренних органов. Белок остеопротегерин (OPG) является участником ключевого звена гомеостаза костной ткани (RANK/RANKL/OPG), которое отвечает за правильную регуляцию дифференцировки остеокластов и остеолиз. Нарушение связывания RANKL и OPG является одним из существенных причин возникновения многих заболеваний, которые сопровождаются повышенной продукцией провоспалительных цитокинов, в том числе и ревматоидного артрита. Согласно данным последних лет, различия в генах, контролирующих защитные реакции организма, могут влиять на уровень продукции кодируемых белков и тем самым на характер протекания иммунного ответа при РА. В связи с этим функциональный полиморфизм генов цитокинов представляет значительный интерес, так как именно эти белки вносят наибольший вклад в формирование и развитие данного заболевания. Полиморфизм гена остеопротегерина в точке G1181C приводит к нарушению его транскрипционной активности и конформации самого белка, что может привести к нарушению баланса про- и противовоспалительных цитокинов, которые способствуют развитию и прогрессированию РА.

В данном исследовании проведен анализ связи между полиморфизмом гена TNFRSF11B в точке 1181 G > C и риском развития РА у башкирской популяции. В основе анализа молекулярно-генетическое исследование однонуклеотидного полиморфизма в группах больных ревматоидным артритом и условно здоровых лиц башкирской популяции Челябинской области. Статистическая обработка проводилась с использованием стандартных общепринятых в иммуногенетике критериев.

Для генетического полиморфизма 1181*GC гена остеопротегерина характерны межпопуляционные различия, что подтверждает значимость использования этнически идентичной группы сравнения для оценки ассоциации с предрасположенностью к мультифакторной патологии.

Адрес для переписки:

Сташкевич Дарья Сергеевна
ФГБОУ «Челябинский государственный университет»
454021, Россия, г. Челябинск,
ул. Молдавская, 25, кв. 15.
Тел.: 8 (351) 799-71-54.
E-mail: Stashkevich_dary@mail.ru

Address for correspondence:

Darya S. Stashkevich
Chelyabinsk State University
25 Moldavskaya St, Apt 15
Chelyabinsk
454021 Russian Federation
Phone: +7 (351) 799-71-54.
E-mail: Stashkevich_dary@mail.ru

Образец цитирования:

Ю.В. Чумачёва, Д.С. Сташкевич, И.В. Девальд, Т.А. Сулова «Однонуклеотидный полиморфизм остеопротегерина как возможный биомаркер ревматоидного артрита в башкирской популяции Челябинской области» // Российский иммунологический журнал, 2023. Т. 26, № 4. С. 521-526.
doi: 10.46235/1028-7221-13964-SNP

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

For citation:

Yu.V. Chumacheva, D.S. Stashkevich, I.V. Devald, T.A. Suslova "Single nucleotide polymorphism of osteoprotegerin as a possible biomarker of rheumatoid arthritis in Bashkir population of Chelyabinsk Region", Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskiy Zhurnal, 2023, Vol. 26, no. 4, pp. 521-526.
doi: 10.46235/1028-7221-13964-SNP

© Chumacheva Yu.V. et al., 2023
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.46235/1028-7221-13964-SNP

Анализ ассоциации исследуемого полиморфизма с предрасположенностью к ревматоидному артриту показал, что в группе больных ревматоидным артритом башкир повышено носительство гетерозиготного генотипа 1181 G/C по сравнению с условно здоровыми башкирами Челябинской области. Гетерозиготный генотип 1181 G/C может рассматриваться в качестве биомаркера предрасположенности к РА. Не было зафиксировано различий частот аллелей и генотипов полиморфизма G1181C гена TNFRSF11B у женщин башкирской популяции больных РА.

Проведенное нами исследование является продолжением изучения комплексной оценки взаимодействия цитокинов и их рецепторов суперсемейства TNF α как иммуногенетического компонента РА.

Ключевые слова: полиморфизм, TNFRSF11B, OPG, остеопротегерин, ревматоидный артрит, башкирская популяция, полиморфизм гена остеопротегерина

SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISM OF OSTEOPROTEGERIN AS A POSSIBLE BIOMARKER OF RHEUMATOID ARTHRITIS IN BASHKIR POPULATION OF CHELYABINSK REGION

Chumacheva Yu.V.^a, Stashkevich D.S.^a, Devald I.V.^a, Suslova T.A.^{a, b}

^a Chelyabinsk State University, Chelyabinsk, Russian Federation

^b Chelyabinsk Regional Blood Transfusion Station, Chelyabinsk, Russian Federation

Abstract. Rheumatoid arthritis (RA) is a multifactorial autoimmune rheumatic disease of unknown etiology characterized by chronic erosive arthritis. The protein osteoprotegerin (OPG) is a member of bone tissue homeostasis (RANK/RANKL/OPG) which is responsible for the regulation of osteoclast differentiation and osteolysis. The altered binding of RANKL and OPG is one of the causes of many diseases with increased production of pro-inflammatory cytokines, including rheumatoid arthritis. Polymorphic variants of the genes that control protective reactions could affect the level of production for encoded proteins and, thus, changing the course of immune response in RA. G1181C SNP in osteoprotegerin gene leads to disruption of its transcriptional activity and conformation of the protein itself, which can lead to an imbalance of pro- and anti-inflammatory cytokines. We analyzed the relationship between the TNFRSF11B gene polymorphism at the 1181 G > C position and the risk of developing RA in the Bashkir population. The analysis was based on a molecular genetic study of single nucleotide polymorphism in groups of patients with rheumatoid arthritis and conditionally healthy individuals of the Bashkir population of the Chelyabinsk Region. Statistical evaluation was carried out using standard criteria generally accepted in immunogenetics. The 1181*GC polymorphism of the osteoprotegerin gene is characterized by interpopulation differences, which confirms the importance of using an ethnically identical comparison group to assess the association with a predisposition to multifactorial pathology. We showed that the carriage of genotype 1181 G/C was increased in the group of Bashkirs with rheumatoid arthritis. This genotype could be considered a biomarker of susceptibility to RA. No differences in the SNP allelic frequencies and genotypes were found among women with RA. Our research is a part of comprehensive assessment of the interaction of cytokines and their receptors from the TNF α superfamily as an immunogenetic component of RA genesis.

Keywords: polymorphism, TNFRSF11B, OPG, osteoprotegerin, rheumatoid arthritis, Bashkir population, gene polymorphism

Введение

Остеопротегерин (OPG) — это гликопротеин представитель суперсемейства фактора некроза опухолей, являющийся цитокиновым рецептором TNF α , кодируется геном TNFRSF11B, рас-

положенным на коротком плече 8 хромосомы [1]. Он синтезируется остеобластами, клетками стромы, эндотелием сосудов и В-лимфоцитами. OPG был впервые обнаружен как новый секретиремый белок, связанный с TNFR, который играл

роль в регуляции плотности костной ткани, а затем как рецептор-приманка для активатора рецептора ядерного фактора каппа-В лиганда (RANKL). OPG также связывается с связанным с TNF апоптозом лигандом (TRAIL) и ингибирует TRAIL-индуцированный апоптоз специфических клеток, включая опухолевые клетки [6].

Белок OPG является участником ключевого звена гомеостаза костной ткани (RANK/RANKL/OPG), которое отвечает за правильную регуляцию дифференцировки остеокластов и остеолиз. Нарушение связывания RANKL и OPG является одним из существенных причин возникновения многих заболеваний, которые сопровождаются повышенной продукцией провоспалительных цитокинов. Иммунопатогенез ревматоидного артрита (РА) включает в себя сложное взаимодействие между различными клетками иммунной системы и цитокинами [4]. В центре взаимодействия TNF α и OPG при ревматоидном артрите стоит важный процесс, известный как костная резорбция. В начале этого процесса TNF α , уровень которого обычно повышен при ревматоидном артрите, стимулирует дифференцировку и активность остеокластов. TNF α связывается с TNFR1 и TNFR2 на предшественниках остеокластов, что приводит к активации NF- κ B и MAPK путей. Это в свою очередь приводит к увеличению экспрессии RANKL. RANKL является ключевым молекулярным сигналом для дифференцировки и активации остеокластов. RANKL связывается с RANK на предшественниках остеокластов и стимулирует их развитие в активные остеокласты. Белок OPG играет ключевую роль в контроле этого процесса. Он служит «ловушкой» для RANKL, связывая его и предотвращая связывание с RANK. Поэтому, когда OPG присутствует в достаточном количестве, он может подавить активацию остеокластов и предотвратить костную резорбцию. Однако при ревматоидном артрите TNF α может подавить продукцию OPG, усиливая тем самым костную резорбцию. Кроме того, TNF α может стимулировать продукцию RANKL, еще больше облегчая дифференцировку и активность остеокластов. При этом другие цитокины, такие как IL-1 и IL-6, также усиливают этот процесс. IL-1 может увеличивать продукцию RANKL и подавлять продукцию OPG, в то время как IL-6 может способствовать дифференцировке остеокластов, увеличивая экспрессию RANK.

Взаимодействие TNF α и OPG влияет на баланс между костной резорбцией и формированием костной ткани, что в итоге приводит к ускоренной потере костной массы при ревматоидном артрите [7]. Таким образом, баланс между провоспалительными и противовоспалительными цитокинами определяет прогрессирование рев-

матоидного артрита. Нарушение этого баланса в пользу провоспалительных цитокинов ведет к хроническому воспалению и деструкции суставов, что является характерной чертой РА. Одним из факторов, регулирующих экспрессию и функционирование цитокинов и их рецепторов, является генетический полиморфизм их генов.

Полиморфизм гена TNFRSF11B в точке G1181C приводит к нарушению его транскрипционной активности и конформации самого белка, что может привести к нарушению баланса про- и противовоспалительных цитокинов, которые способствуют развитию и прогрессированию РА через дисбаланс в системе RANK/RANKL/OPG, влияющем на активацию остеокластов и последующую продукцию провоспалительных цитокинов. В настоящее время ведется много исследований полиморфизма гена TNFRSF11B для оценки ассоциации с различными заболеваниями, в том числе и с ревматоидным артритом [5, 6, 7, 8, 9, 10].

Цель исследования – оценка ассоциации полиморфизма в позиции G1181C гена TNFRSF11B с предрасположенностью к РА больных башкирской популяции Челябинской области.

Материалы и методы

Данное исследование является ретроспективным. 62 человека группы башкир Челябинской области с диагнозом РА были отобраны врачами-ревматологами (средний возраст $47,2 \pm 1,4$ на момент формирования группы). Группу сравнения – 138 кадровых доноров стволовой клетки ГБУЗ «ЧОСПК», проживающих в г. Челябинске и Челябинской области (средний возраст $36,1 \pm 0,98$ на момент формирования группы). Генотипирование полиморфного локуса проводили методом аллель-специфической ПЦР (реактивы ООО «НПФ Литех»). Для расчета достоверности различий аллелей и генотипов использовали программу Past, критерий χ^2 , OR с расчетом 95% ДИ. Во всех случаях различия считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение

В связи с тем, что данный полиморфизм исследуется впервые, было установлено распределение аллелей, генотипов 1181 G/C гена TNFRSF11B в группе условно здоровых лиц башкирской популяции Челябинской области. Для определения возможных межпопуляционных различий мы сравнили данные по частотам встречаемости в обследуемой популяции башкир Челябинской области с популяциями русских Челябинской области и казахов Казахстана и Узбекистана (данные о популяции казахов предоставлены проек-

том «1000 геномов»). Результаты представлены в таблицах 1, 2.

Нами показано, что частота мутантного аллеля 1181*С популяции башкир Челябинской области ниже, чем частоты в популяции казахов Казахстана и Узбекистана (46,7% против 79%, $\chi^2 = 35,796$, $p < 0,001$). Частота встречаемости гомозиготного генотипа 1181 С/С гена TNFRSF11B в популяции башкир Челябинской области ниже, чем в популяции сравнения (22,5% против 63%, $\chi^2 = 30,765$, $p < 0,001$). Встречаемость гомозиготного генотипа GG гена TNFRSF11B в группе башкир выше, чем популяции казахов Казахстана и Узбекистана (29% против 5%, $\chi^2 = 14,151$, $p < 0,001$) (табл. 1).

Частоты встречаемости аллелей и генотипов не различались между группами башкир Челябинской области и русских Челябинской области (табл. 2). В целом распределение аллелей и генотипов исследуемого полиморфизма ближе к таковому в европеоидных популяциях и отличается от монголоидных популяций.

На следующем этапе исследования мы установили особенности распределения частот аллелей и генотипов полиморфизма G1181C гена TNFRSF11B в группе больных башкир РА с группой условно здоровых людей башкирской популяции (табл. 3).

В результате проведенного анализа было установлено статистически значимое различие

ТАБЛИЦА 1. СРАВНЕНИЕ ЧАСТОТ ВСТРЕЧАЕМОСТИ АЛЛЕЛЕЙ И ГЕНОТИПОВ ПОЛИМОРФИЗМА 1181 G/C ГЕНА TNFRSF11B МЕЖДУ ГРУППОЙ БАШКИР ЧЕЛЯБИНСКОЙ ОБЛАСТИ И КАЗАХАМИ КАЗАХСТАНА И УЗБЕКИСТАНА

TABLE 1. COMPARISON OF FREQUENCIES OF OCCURRENCE OF ALLELES AND GENOTYPES OF POLYMORPHISM 1181 G/C OF TNFRSF11B GENE BETWEEN A GROUP OF BASHKIRS OF CHELYABINSK REGION AND KAZAKHS OF KAZAKHSTAN AND UZBEKISTAN

Аллель Allele	Башкиры Челябинской области Bashkirs of Chelyabinsk Region		Казахи Казахстана и Узбекистана Kazakhs of Kazakhstan and Uzbekistan		χ^2 , p
	Кол-во Number	%	Кол-во Number	%	
G	147	53,3	25	21	$\chi^2 = 35,796$; $p < 0,001$
C	129	46,7	95	79	
Генотип Genotype					
GG	40	29	3	5	$\chi^2 = 14,151$; $p < 0,001$
GC	67	48,5	19	32	$\chi^2 = 4,852$; $p = 0,028$
CC	31	22,5	38	63	$\chi^2 = 30,765$; $p < 0,001$

ТАБЛИЦА 2. СРАВНЕНИЕ ЧАСТОТ ВСТРЕЧАЕМОСТИ АЛЛЕЛЕЙ И ГЕНОТИПОВ ПОЛИМОРФИЗМА 1181 G/C ГЕНА TNFRSF11B МЕЖДУ ГРУППОЙ БАШКИР И РУССКИХ ЧЕЛЯБИНСКОЙ ОБЛАСТИ

TABLE 2. COMPARISON OF THE FREQUENCIES OF ALLELES AND GENOTYPES OF THE 1181 G/C POLYMORPHISM OF THE TNFRSF11B GENE BETWEEN THE BASHKIR AND THE RUSSIANS OF THE CHELYABINSK REGION

Аллель Allele	Башкиры Челябинской области Bashkirs of Chelyabinsk Region		Русские Челябинской области Russians of Chelyabinsk Region		χ^2 , p
	Кол-во Number	%	Кол-во Number	%	
G	147	53,3	172	49,7	$\chi^2 = 0,774$; $p = 0,379$
C	129	46,7	174	50,3	
Генотип Genotype					
GG	40	29	39	22,5	$\chi^2 = 0,988$; $p = 0,321$
GC	67	48,5	94	54,3	$\chi^2 = 1,029$; $p = 0,311$
CC	31	22,5	40	23,2	$\chi^2 = 0,019$; $p = 0,891$

ТАБЛИЦА 3. РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ЧАСТОТ АЛЛЕЛЕЙ И ГЕНОТИПОВ ПОЛИМОРФИЗМА 1181 G/C ГЕНА TNFRSF11B МЕЖДУ БОЛЬНЫМИ РА И ГРУППОЙ УСЛОВНО ЗДОРОВЫХ ЛИЦ БАШКИРСКОЙ ПОПУЛЯЦИИ ЧЕЛЯБИНСКОЙ ОБЛАСТИ

TABLE 3. DISTRIBUTION OF ALLELES AND GENOTYPES FREQUENCIES 1181 G/C OF THE TNFRSF11B GENE BETWEEN PATIENTS WITH RA AND A GROUP OF HEALTHY INDIVIDUALS OF BASHKIR POPULATION OF THE CHELYABINSK REGION

Аллель Allele	Больные РА RA patients		Условно здоровые лица Healthy persons		χ^2 , p, OR, CI
	Кол-во Number	%	Кол-во Number	%	
G	64	51,6	147	53,3	$\chi^2 = 0,093$; p = 0,761
C	60	48,4	129	46,7	
Генотип Genotype					
GG	12	19,4	40	29	$\chi^2 = 2,062$; p = 0,151
GC	40	64,5	67	48,5	$\chi^2 = 4,383$; p = 0,031, OR = 1,927, CI = (1,038; 3,575)
CC	10	16,1	31	22,5	$\chi^2 = 1,053$; p = 0,305

между группой больных РА и группой сравнения: было зафиксировано увеличение гетерозиготного генотипа 1181*GC у больных по сравнению с условно здоровыми лицами (64,5% против 48,5%, $\chi^2 = 4,383$, p = 0,031). Отношение шансов указывает на то, что гетерозиготный генотип 1181*GC является биомаркером РА (OR = 1,927, CI = (1,038-3,575)).

Согласно литературным данным, РА чаще встречается у женщин [4], в связи с чем актуальным является поиск дополнительных факторов риска отдельно в группах РА женщин и мужчин. Частоты встречаемости аллелей, генотипов, образованных исследуемым полиморфизмом, не отличались между группами больных и условно здоровых женщин башкирской популяции. Группу больных мужчин в результатах не учитываем ввиду их малого количества.

Заключение

Для генетического полиморфизма 1181*GC гена остеопротегерина характерны межпопуляционные различия, что подтверждает значимость использования этнически идентичной группы сравнения для оценки ассоциации с предрасположенностью к мультифакторной патологии. Популяция башкир Челябинской области несет в своем генофонде генетические черты как европейского, так и монголоидного происхождения с преобладанием монголоидных генов [2], однако в нашей работе показано, что для 1181*GC TNFRSF11B были найдены статистически значимые различия с представителями других монголоидных популяций: казахами Казахстана и

Узбекистана. Полученные результаты подтверждают необходимость учета не только этнического происхождения, но и территориального проживания при формировании групп сравнения для оценки ассоциации генетического полиморфизма с предрасположенностью к ревматоидному артриту.

Анализ ассоциации исследуемого полиморфизма с предрасположенностью к ревматоидному артриту показал, что в группе больных ревматоидным артритом башкир повышено носительство гетерозиготного генотипа 1181 G/C по сравнению с условно здоровыми башкирами Челябинской области. Гетерозиготный генотип 1181 G/C может рассматриваться в качестве биомаркера предрасположенности к РА. Не было зафиксировано различий частот аллелей и генотипов полиморфизма G1181C гена TNFRSF11B у женщин башкирской популяции больных РА.

Наши данные не подтверждают исследования следующих авторов: Nava-Valdivia и соавт. сообщили, что полиморфизм гена TNFRSF11B не повышал риск развития РА [5], Хуе J.В. [10] продемонстрировал, что полиморфизм TNFRSF11B в точке G1181C не был связан с риском развития РА. Размер выборки, генетическое разнообразие и клиническая гетерогенность могут объяснить результаты данных противоречий.

Проведенное нами исследование является продолжением изучения комплексной оценки взаимодействия цитокинов и их рецепторов суперсемейства TNF α как иммуногенетического компонента РА.

Список литературы / References

1. Герштейн Е.С., Тимофеев Ю.С., Зуев А.А., Кушлинский Н.Е. Лиганд-рецепторная система RANK/RANKL/OPG и ее роль при первичных новообразованиях костей (анализ литературы и собственные результаты) // Успехи молекулярной онкологии, 2015. Т. 2, № 3. С. 51-59. [Gerstein E.S., Timofeev Yu.S., Zuev A.A., Kushlinsky N.E. Ligand-receptor system RANK/RANKL/OPG and its role in primary bone neoplasms (literature analysis and own results). *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology*, 2015, Vol. 2, no. 3, pp. 51-59. (In Russ.)]
2. Евдокимов А.В., Бурмистрова А.Л., Сулова Т.А. Определение частоты распределения точкового полиморфизма 745C>T гена TLR6 в популяциях нагайбаков и башкир Челябинской области // Российский иммунологический журнал, 2014. Т. 8, № 3 (17). С. 311-314. [Evdokimov A.V., Burmistrova A.L., Suslova T.A. Determination of the frequency of distribution of the current polymorphism 745 C>T of the TLR6 gene in the populations of Nagaibaks and Bashkirs of the Chelyabinsk region. *Rossiyskiy immunologicheskii zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2014, Vol. 8, no. 3 (17), pp. 311-314. (In Russ.)]
3. Коненков В.И., Зоннова Е.В., Королев М.А., Прокофьев В.Ф., Шевченко А.В. Полиморфизм биологических маркеров течения ревматоидного артрита среди русских женщин европеоидного происхождения. Текст: электронный // НИИКЭЛ СО РАМН. [Konenkov V.I., Zonova E.V., Korolev M.A., Prokofiev V.F., Shevchenko A.V. Distribution of allelic variants of promotor sites of cytokine genes and endothelial growth factor gene among healthy subjects and patients with rheumatoid arthritis in a Russian Europeoid population. – Text: electronic // NIIEKEL SB RAMS (In Russ.)]
4. Насонов Е.Л. Клинические рекомендации РФ 2021 (Россия). Ревматоидный артрит [Электронный ресурс]. Клинические рекомендации. Ревматоидный артрит. Минздрав РФ, ассоциация ревматологов России, 2021. 112 с. Режим доступа: <https://diseases.medelement.com/disease/ревматоидный-артрит-кп-рф-2021/17003?ysclid=llov4faw5q546452247>. [Nasonov E.L. Clinical recommendations of the Russian Federation 2021 (Russia). Rheumatoid arthritis [Electronic resource]. Clinical recommendations. Rheumatoid arthritis. Ministry of Health of the Russian Federation, Association of Rheumatologists of Russia, 2021. 112 p. Access mode: <https://diseases.medelement.com/disease/ревматоидный-артрит-кп-рф-2021/17003?ysclid=llov4faw5q546452247>. (In Russ.)]
5. Nava-Valdivia C.A., Saldaña-Cruz A.M., Corona-Sanchez E.G., Murillo-Vazquez J.D., Moran-Moguel M.C., Salazar-Paramo M., Perez-Guerrero E.E., Vazquez-Villegas M.L., Bonilla-Lara D., Rocha-Muñoz A.D., Martín-Marquez B.T., Sandoval-García F., Martínez-García E.A., Fajardo-Robledo N.S., Ponce-Guarneros J.M., Ramirez-Villafañá M., Alcaraz-Lopez M.F., Gonzalez-Lopez L., Gamez-Nava J.I. Polymorphism rs2073618 of the TNFRSF11B (OPG) gene and bone mineral density in mexican women with rheumatoid arthritis. *J. Immunol. Res.*, 2017, Vol. 2017, 7680434. doi:10.1155/2017/7680434.
6. Reid P.E., Brown N.J., Holen I. Breast cancer cells stimulate osteoprotegerin (OPG) production by endothelial cells through direct cell contact. *Mol. Cancer*, 2009, Vol. 8, 49. doi: 10.1186/1476-4598-8-49.
7. Seriolò B., Paolino S., Sulli A., Ferretti V., Cutolo M. Bone metabolism changes during anti-TNF-alpha therapy in patients with active rheumatoid arthritis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 2006, Vol. 1069, 420-427.
8. Vidal C., Brincat M., Xuereb A.A. TNFRSF11B gene variants and bone mineral density in postmenopausal women in Malta. *Maturitas*, 2012, Vol. 53, pp. 386-395.
9. Yang H., Liu W., Zhou X., Rui H., Zhang H., Liu R. The association between RANK, RANKL and OPG gene polymorphisms and the risk of rheumatoid arthritis: a case-controlled study and meta-analysis. *Biosci. Rep.*, 2019, Vol. 39, no. 6, BSR20182356. doi:10.1042/BSR20182356.
10. Xue J.B., Zhan X.L., Wang W.J., Yan Y.G., Liu C. OPG rs2073617 polymorphism is associated with upregulated OPG protein expression and an increased risk of intervertebral disc degeneration. *Exp. Ther. Med.*, 2016, Vol. 12, no. 2, pp. 702-710.

Авторы:

Чумачёва Ю.В. – аспирант биологического факультета направления «Аллергология и иммунология», старший лаборант кафедры микробиологии, иммунологии и общей биологии ФГБОУ «Челябинский государственный университет», г. Челябинск, Россия

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

Девальд И.В. – к.м.н., врач-ревматолог, доцент ФГБОУ «Челябинский государственный университет», г. Челябинск, Россия

Сулова Т.А. – к.м.н., доцент ФГБОУ «Челябинский государственный университет»; врач ГБУЗ «Челябинская областная станция переливания крови», г. Челябинск, Россия

Authors:

Chumacheva Yu.V., Postgraduate Student, Faculty of Biology, Senior Laboratory Assistant, Department of Microbiology, Immunology and General Biology, Chelyabinsk State University, Chelyabinsk, Russian Federation

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

Devald I.V., PhD (Medicine), Clinical Rheumatologist, Associate Professor, Chelyabinsk State University, Chelyabinsk, Russian Federation

Suslova T.A., PhD (Medicine), Associate Professor, Chelyabinsk State University; Physician, Chelyabinsk Regional Blood Transfusion Station, Chelyabinsk, Russian Federation

Поступила 10.07.2023
Принята к печати 12.07.2023

Received 10.07.2023
Accepted 12.07.2023

ЭКСПРЕССИЯ «НЕКЛАССИЧЕСКИХ» МОЛЕКУЛ ГЛАВНОГО КОМПЛЕКСА ГИСТОСОВМЕСТИМОСТИ ПРИ РЕВМАТОИДНОМ АРТРИТЕ И БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЕ

Боева О.С.^{1, 2}, Борисевич В.И.³, Козлов В.А.¹, Демина Д.В.¹,
Сизиков А.Э.¹, Пашкина Е.А.¹

¹ ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии»,
г. Новосибирск, Россия

² ФГАОУ ВО «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет»,
г. Новосибирск, Россия

³ ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Министерства
здравоохранения РФ, г. Новосибирск, Россия

Резюме. Одним из малочисленно изученных «неклассических» генов HLA, представляется HLA-E. Транскрипция HLA-E обнаружена во многих типах клеток, в особенности в иммунных клетках, таких как Т- и В-лимфоцитах, моноцитах и макрофагах. В данной работе была оценена экспрессия HLA-E на CD8⁺, CD4⁺ и CD14⁺ клетках у условно здоровых доноров и пациентов с бронхиальной астмой и ревматоидным артритом. В качестве материала для исследования использовались мононуклеарные клетки периферической крови (МНК ПК) пациентов с иммунопатологиями и соматически здоровых доноров. МНК ПК пациентов с РА (n = 15), БА (n = 11) и условно здоровых доноров (n = 14) выделяли из периферической крови в градиенте плотности фиколл-урографина (1,077 г/мл). Затем клетки окрашивали моноклональными антителами, конъюгированными с флюорохромами: анти-CD3-APC, анти-CD4-APC-Cy7, анти-CD-14-FITC и анти-HLA-E-PerCP/Cy5. Фенотип клеток анализировали на проточном цитофлуориметре FACS Canto II (BD Biosciences, США). Нами было обнаружено, что при РА увеличивается экспрессия HLA E CD8⁺, CD4⁺Т-лимфоцитах, а также на CD14⁺ (моноциты), по сравнению с пациентами с БА. Также были показаны достоверные различия экспрессии HLA E на CD8⁺Т-клетках между условно здоровыми донорами и пациентами с РА.

Ключевые слова: ревматоидный артрит, бронхиальная астма, неклассические молекулы главного комплекса гистосовместимости, аутоиммунные заболевания, аллергические заболевания

Адрес для переписки:

Боева Ольга Сергеевна
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
фундаментальной и клинической иммунологии»
630099, Россия, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14.
Тел.: 8 (383) 227-01-35.
E-mail: starchenkova97@gmail.com

Address for correspondence:

Olga S. Boeva
Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology
14 Yadrintsevskaya St
Novosibirsk
630099 Russian Federation
Phone: +7 (383) 227-01-35.
E-mail: starchenkova97@gmail.com

Образец цитирования:

О.С. Боева, В.И. Борисевич, В.А. Козлов,
Д.В. Демина, А.Э. Сизиков, Е.А. Пашкина
«Экспрессия “неклассических” молекул главного
комплекса гистосовместимости при ревматоидном
артрите и бронхиальной астме» // Российский
иммунологический журнал, 2023. Т. 26, № 4. С. 527-532.
doi: 10.46235/1028-7221-13919-EON

© Боева О.С. и соавт., 2023

Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

O.S. Boeva, V.I. Borisevich, V.A. Kozlov, D.V. Demina,
A.E. Sizikov, E.A. Pashkina “Expression of “non-classical”
molecules of the main histocompatibility complex in
rheumatoid arthritis and bronchial asthma”, Russian Journal
of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2023,
Vol. 26, no. 4, pp. 527-532.
doi: 10.46235/1028-7221-13919-EON

© Boeva O.S. et al., 2023

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

DOI: 10.46235/1028-7221-13919-EON

EXPRESSION OF “NON-CLASSICAL” MOLECULES OF THE MAIN HISTOCOMPATIBILITY COMPLEX IN RHEUMATOID ARTHRITIS AND BRONCHIAL ASTHMA

Boeva O.S.^{a, b}, Borisevich V.I.^c, Kozlov V.A.^a, Demina D.V.^a, Sizikov A.E.^a, Pashkina E.A.^a

^a Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

^b Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russian Federation

^c Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Novosibirsk, Russian Federation

Abstract. HLA-E is a minor understudied non-classical HLA genes. HLA-E transcription is revealed in many cell types, especially, in immune cells, e.g., T and B cells monocytes, macrophages. In this work, we evaluated expression of HLA-E on CD8⁺, CD4⁺ and CD14⁺ cells in conditionally healthy donors and in the patients with bronchial asthma (BA) and rheumatoid arthritis (RA). Peripheral blood mononuclears (PBMNC) were used as initial biomaterial. PBMNC from RA patients (n = 15), BA (n = 11) and healthy donors were separated from peripheral blood in Ficoll-Urographin density gradient (1.077 g/mL). The cells were then stained with fluorochrome-conjugated monoclonal antibodies: anti-CD3-APC, anti-CD4-APC-Cy7, anti-CD-14-FITC, and anti-HLA-E-PerCP/Cy5. The cell phenotype was analyzed by flow cytometry with FACS Canto II (BD Biosciences, USA). We have found an increased expression of HLA-E on CD8⁺, CD4⁺T cells, like as on CD14⁺ cells (monocytes) in the RA patients, when compared with BA patients. We have also shown significant differences of HLA-E expression on CD8⁺T cells between the conditionally healthy donors and RA patients.

Keywords: rheumatoid arthritis, bronchial asthma, major histocompatibility complex molecules, non-classical, autoimmune diseases, allergic diseases

Исследование выполнено за счет средств федерального бюджета для выполнения государственного задания на научно-исследовательскую работу «Разработка новых критериев эффективности таргетной иммунотерапии тяжелых форм аллергических заболеваний на основе оценки биомаркеров клеток, участвующих в иммунном ответе на аллерген (код тематики 0415-2023-0005).

Введение

На сегодняшний день в дополнение к высокополиморфным генам «классических» МНС класса I и класса II существует множество генов «неклассических» МНС [1]. Одним из «неклассических» генов представляется HLA-E, который является членом неклассических генов HLA класса Ib и расположен в локусе главного комплекса гистосовместимости (МНС) на хромосоме 6 между HLA-A и HLA-C. Структура HLA-E практически идентична классическим молекулам HLA класса Ia с соединением тяжелой цепи с инвариантной легкой цепью β-2-микроглобулина [5]. В мировой популяции доминируют только две изоформы, совокупная частота аллелей которых превышает 99%: *HLA-E*01:01* и *HLA-E*01:03*, которые различаются по положению 107 аминокислоты в белковой молекуле HLA-E, в *HLA-E*01:01* на данной позиции находится аргинин (R), а в *HLA-E*

**01:03* – глицин (G) [12]. На сегодняшний день до конца не изучена роль данных молекул, в особенности, при аллергических и аутоиммунных заболеваниях.

Транскрипция HLA-E была обнаружена почти во всех типах клеток, хотя экспрессия соответствующего белка на поверхности клеток в основном ограничена эндотелиальными клетками, Т- и В-лимфоцитами, моноцитами и макрофагами. Интересно, что, в то время как клетки иммунной системы экспрессируют HLA-E на высоком уровне, эндотелиальные клетки, наоборот, имеют сниженный уровень HLA-E на своей поверхности. Экспрессия HLA-E на эндотелиальных клетках усиливается после воздействия провоспалительных цитокинов, таких как фактор некроза опухоли, интерлейкин-1β, интерферон γ [4, 5, 11]. Также было продемонстрировано, что другая «неклассическая» молекула МНС, HLA-G может модулировать экспрессию HLA-E. Экспрессия различных изоформ HLA-G может влиять на поверхностную экспрессию HLA-E, которая зависит от доступности пептидов, полученных из молекул HLA-G и других молекул HLA-класса I [10].

У человека МНС класса Ib молекула HLA-E играет необычную роль в распознавании НК-клетками и CD8⁺T-лимфоцитами. Комплекс из HLA-E и презентруемого пептида может свя-

зываются с ингибирующим рецептором NKG2A: CD94, экспрессированным на NK-клетках, и ингибировать цитотоксическую активность NK-клеток [1]. Но помимо NKG2A, HLA-E также может связываться с NKG2C. NKG2C экспрессируется как на NK-клетках, так и на Т-клетках, и, по-видимому, играет роль активирующего рецептора. В белке NKG2C по сравнению с NKG2A имеются некоторые аминокислотные различия, что приводит к 6-кратному снижению сродства к HLA-E NKG2C, в связи с чем взаимодействие экспрессирующей HLA-E клетки и NK зачастую приводит к ингибированию цитотоксической активности [13]. HLA-E также может связывать лидерные пептиды с белком теплового шока Hsp60sp [6], являющегося одним из аларминов и способного вызвать активацию иммунной системы, что может способствовать развитию воспалительного процесса при различных иммунопатологиях. Следовательно, представляется актуальным исследование уровня экспрессии HLA-E при различных видах иммунопатологий, в том числе при аутоиммунной патологии – ревматоидном артрите (РА) и аллергической форме бронхиальной астмы (БА).

Материалы и методы

В качестве материала для исследования использовались мононуклеарные клетки периферической крови (МНК ПК) пациентов с иммунопатологиями, находившихся на лечении в клинике иммунопатологии НИИФКИ, и соматически здоровых доноров, после подписания указанными лицами информированного согласия. МНК ПК пациентов с РА (n = 15), БА (n = 11) и условно здоровых доноров (n = 14) выделяли из периферической крови в градиенте плотности фиколл-урографина (1,077 г/мл). Затем клетки окрашивали моноклональными антителами, конъюгированными с флюорохромами: анти-CD3-APC, анти-CD4-APC-Cy7, анти-CD14-FITC и анти-HLA-E-PerCP/Cy5. Фенотип клеток анализировали на проточном цитофлуориметре FACS Canto II (BD Biosciences, США). Анализ проводился с помощью GraphPad Prism 9.3.1, с использованием критерия Краскела–Уоллиса. Значение p ($p < 0,05$) считалось минимальным критерием для статистической значимости.

Результаты и обсуждение

Нами было обнаружено, что при РА увеличивается экспрессия HLA E CD8⁺, CD4⁺Т-лимфоцитах, а также на CD14⁺ (моноциты), по сравнению с пациентами с БА (рис 1, 2). Также были показаны достоверные различия экспрессии HLA E на CD8⁺Т-клетках между условно здоровыми донорами и пациентами с РА (рис. 3).

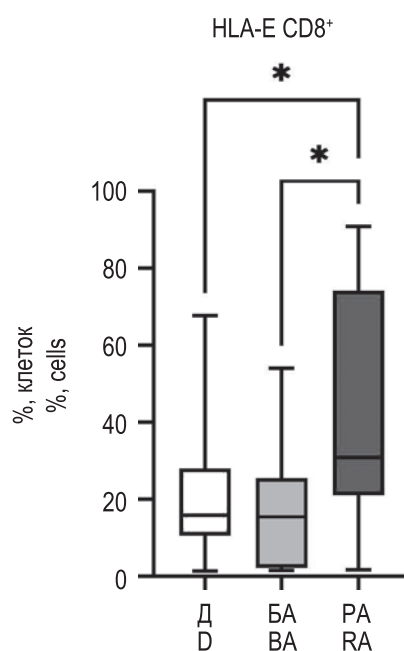


Рисунок 1. Экспрессия молекул HLA-E на CD8⁺Т-клетках у условно здоровых доноров и пациентов с бронхиальной астмой и при ревматоидном артрите
Примечание. * – достоверные различия по сравнению с донорами.

Figure 1. Expression of HLA-E molecules on CD8⁺T cells in healthy donors and patients with bronchial asthma and rheumatoid arthritis

Note. *, significant differences compared with donors.

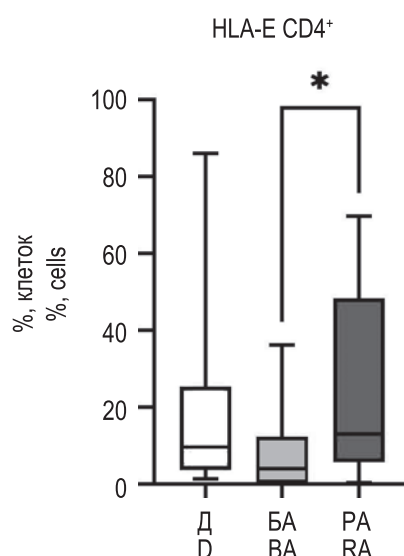


Рисунок 2. Экспрессия молекул HLA-E на CD4⁺Т-клетках у условно здоровых доноров и пациентов с бронхиальной астмой и при ревматоидном артрите
Примечание. * – достоверные различия по сравнению с донорами.

Figure 2. Expression of HLA-E molecules on CD4⁺T cells in healthy donors and patients with bronchial asthma and rheumatoid arthritis

Note. *, significant differences compared with donors.

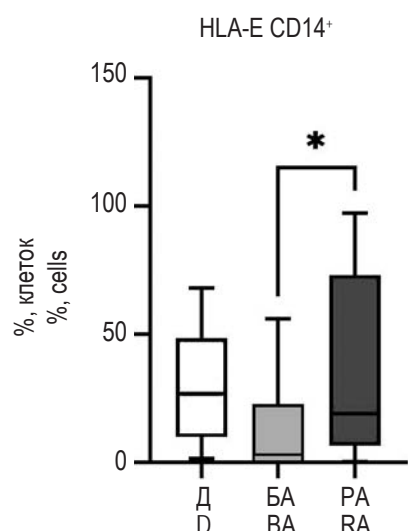


Рисунок 3. Экспрессия молекул HLA-E на CD14⁺Т-клетках у условно здоровых доноров и пациентов с бронхиальной астмой и при ревматоидном артрите

Примечание. * – достоверные различия по сравнению с донорами.

Figure 3. Expression of HLA-E molecules on CD14⁺T cells in healthy donors and patients with bronchial asthma and rheumatoid arthritis

Note. *, significant differences compared with donors.

В настоящее время многие исследования направлены на изучение влияния взаимодействия молекул HLA-E с ингибирующими рецепторами NKG2A/CD94 при аутоиммунных заболеваниях, таких как ревматоидный артрит, аутоиммунный энцефаломиелит и другие.

НК-клетки способны уничтожать аутореактивные Т-клетки, однако при высокой экспрессии NKG2A в НК-клетках, наоборот, предотвращается этот процесс. Следовательно, блокада взаимодействия NKG2A с лигандом является эффективным подходом для лечения аутоиммунных заболеваний. Взаимодействие NKG2A с лигандом приводит к развитию иммунологической памяти и клональной экспансии аутореактивных Т-клеток, а также способствует защите активированных CD4⁺Т-клеток от лизиса NKG2A⁺ НК-клетками [7].

Также повышение экспрессии NKG2A наблюдалось в НК-клетках пациентов с болезнью Грейвса и впервые выявленным псориазом, а также у пациентов с системной красной волчанкой (СКВ) и у пациентов с ревматоидным артритом (РА), что указывает на то, что отсутствие ингибирующих сигналов может привести к гиперактивации Т-клеток и иммунологическим нарушениям [13].

Есть данные о том, что НК-клетки проявляют более высокую цитотоксическую активность против активированных CD4⁺Т-клеток, которые были получены от мышей с дефицитом Qa-1 (аналог «неклассических» молекул MHC I клас-

са у мышей). Также было показано на мышинной модели ревматоидного артрита (РА), что блокирование NKG2A ускоряло опосредованное НК-клетками уничтожение патогенных Т-хелперов 17 (Th17) клеток, а также фолликулярных Т-хелперов (Tfh) клеток, тем самым останавливало прогрессирование заболевания [7].

Исследования, направленные на изучение экспрессии молекул HLA-G и HLA-E в бронхиальном эпителии, подтверждают гипотезу об участии этих молекул в ремоделировании ткани бронхов при бронхиальной астме. Все изоформы HLA-G экспрессировались в полностью дифференцированных НВЕС (клетках бронхиального эпителия человека) у здоровых доноров и пациентов с БА, как со средней степенью тяжести, так и с тяжелой БА. Экспрессия мРНК HLA-G была значительно снижена у пациентов с БА по сравнению с со здоровыми донорами [17]. Также было показано сверхэкспрессия HLA-E в опухолевых клетках при колоректальном раке, которая была связана с ингибированием NK или CD94⁺/NKG2A⁺/CD8⁺Т-клеток, инфильтрирующих опухолевую ткань [2].

Вышеупомянутые результаты могут подтвердить участие HLA-G в пролиферации и дифференцировке эпителиальных клеток [8, 9]. Согласно литературным данным, структурное ремоделирование бронхиального эпителия и нарушение разрешения воспаления, которое наблюдается при бронхиальной астме, могут быть результатом внутренних дефектов клеток бронхиального эпителия человека, что проявляется в экспрессии изоформы «неклассических» молекул HLA-G, а не дисфункции иммунных клеток.

Таким образом, группа «неклассических» молекул главного комплекса гистосовместимости, в частности HLA-E, является перспективным направлением для дальнейшего изучения. Накопленные данные позволяют утверждать об их роли в патогенезе различных заболеваний иммунной природы. На экспериментальных моделях продемонстрированы положительные результаты, указывающие на возможные терапевтические подходы в лечении аутоиммунных заболеваний. Особый интерес представляет значение генов HLA-E при бронхиальной астме, поскольку на данный момент небольшое количество исследований подчеркивают их участие в развитии данного заболевания и пока указывается лишь их косвенное влияние.

Выводы

Было обнаружено увеличение экспрессии HLA-E на иммунокомпетентных клетках при РА, что свидетельствует о возможной роли данной молекулы в патогенезе данного заболевания.

Список литературы / References

1. Мерфи К., Уивер К. Иммунобиология по Джанвэю: пер. с англ.; под ред. Г.А. Игнатъевой, О.А. Сви-тич, И.Н. Дьякова. М.: Логосфера, 2020. 1184 с. [Murphy K., Weaver K. Janway Immunobiology. Transl. from English; ed. G.A. Ignatieva, O.A. Svitich, I.N. Dyakova]. Moscow: Logosfera, 2020. 1184 p.
2. Carlini F., Picard C., Garulli C., Piquemal D., Roubertoux P., Chiaroni J., Chanez P., Gras D., di Cristofaro J. Bronchial epithelial cells from asthmatic patients display less functional HLA-G isoform expression. *Front. Immunol.*, 2017, Vol. 8, 6. doi: 10.3389/fimmu.2017.00006.
3. Coupel S., Moreau A., Hamidou M., Horejsi V., Souillou J.P., Charreau B. Expression and release of soluble HLA-E is an immunoregulatory feature of endothelial cell activation. *Blood*, 2007, Vol. 109, no. 7, pp. 2806-2814.
4. Iwaszko M., Bogunia-Kubik K. Clinical significance of the HLA-E and CD94/NKG2 interaction. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz)*, 2011, Vol. 59, no. 5, pp. 353-367.
5. Kochan G., Escors D., Breckpot K., Guerrero-Setas D. Role of non-classical MHC class I molecules in cancer immunosuppression. *Oncimmunology*, 2013, Vol. 2, no. 11, e26491. doi: 10.4161/onci.26491.
6. Kraemer T., Celik A.A., Huyton T., Kunze-Schumacher H., Blasczyk R., Bade-Döding C. HLA-E: Presentation of a broader peptide repertoire impacts the cellular immune response-implications on HSCT outcome. *Stem Cells Int.*, 2015, Vol. 2015, 346714. doi: 10.1155/2015/346714.
7. Leavenworth J.W., Wang X., Wenander C.S., Spee P., Cantor H. Mobilization of natural killer cells inhibits development of collagen-induced arthritis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 2011, Vol. 108, no. 35, pp. 14584-14589.
8. Lim R., Chan S.T., Tan J.L., Mockler J.C., Murphy S.V., Wallace E.M. Preterm human amnion epithelial cells have limited reparative potential. *Placenta*, 2013, Vol. 34, no. 6, pp. 486-492.
9. Melén E., Kho A.T., Sharma S., Gaedigk R., Leeder J.S., Mariani T.J., Carey V.J., Weiss S.T., Tantisira K.G. Expression analysis of asthma candidate genes during human and murine lung development. *Respir. Res.*, 2011, Vol. 12, no. 1, 86. doi: 10.1186/1465-9921-12-86.
10. Morandi F., Pistoia V. Interactions between HLA-G and HLA-E in physiological and pathological conditions. *Front. Immunol.*, 2014, Vol. 5, 394. doi: 10.3389/fimmu.2014.00394.
11. Paech C., Albrecht V., Putke K., Schöfl G., Schöne B., Schmidt A.H., Lange V., Klussmeier A. HLA-E diversity unfolded: Identification and characterization of 170 novel HLA-E alleles. *HLA*, 2021, Vol. 97, no. 5, pp. 389-398.
12. Sauter J., Putke K., Schefzyk D., Pruschke J., Solloch U.V., Bernas S.N., Massalski C., Daniel K., Klussmeier A., Hofmann J.A., Lange V., Schmidt A.H. HLA-E typing of more than 2.5 million potential hematopoietic stem cell donors: Methods and population-specific allele frequencies. *Hum. Immunol.*, 2021, Vol. 82, no. 7, pp. 541-547.
13. Wang X., Xiong H., Ning Z. Implications of NKG2A in immunity and immune-mediated diseases. *Front. Immunol.*, 2022, Vol. 13, 960852. doi: 10.3389/fimmu.2022.960852.

Авторы:

Боева О.С. — студентка ФГАОУ ВО «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет»; лаборант-исследователь лаборатории клинической иммунопатологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Борисевич В.И. — студент ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Новосибирск, Россия

Козлов В.А. — д.м.н., профессор, академик РАН, заведующий лабораторией клинической иммунопатологии, научный руководитель ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Authors:

Boeva O.S., Student, Novosibirsk State University; Assistant Researcher, Laboratory of Clinical Immunopathology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Borisevich V.I., Student, Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russian Federation

Kozlov V.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Full Member, Russian Academy of Sciences, Head, Laboratory of Clinical Immunopathology, Research Director, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Демина Д.В. — к.м.н., врач-аллерголог, заведующая отделением аллергологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Сизиков А.Э. — к.м.н., врач-ревматолог, заведующий отделением ревматологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Папкина Е.А. — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории клинической иммунопатологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Demina D.V., PhD (Medicine), Allergologist, Head, Department of Allergology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Sizikov A.E., PhD (Medicine), Rheumatologist, Head, Department of Rheumatology Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Pashkina E.A., PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Clinical Immunopathology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Поступила 10.07.2023
Принята к печати 12.07.2023

Received 10.07.2023
Accepted 12.07.2023

ОСОБЕННОСТИ ИЗМЕНЕНИЯ УРОВНЯ ВНЕКЛЕТОЧНОЙ ДНК, ПОКАЗАТЕЛЕЙ НЕТОЗА И ВОСПАЛЕНИЯ В ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У ПАЦИЕНТОВ С БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ

**Гаврилова Е.Д., Гойман Е.В., Демченко Е.Н., Демина Д.В.,
Вольский Н.Н., Козлов В.А.**

*ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии»,
г. Новосибирск, Россия*

Резюме. Во многих работах показано, что уровень внеклеточных ДНК (внДНК) в крови пациентов с онкологией, сепсисом, системной красной волчанкой, некоторыми ревматоидными заболеваниями существенно превышает величину аналогичного показателя у здоровых доноров и достаточно тесно связан с клинической картиной заболевания, а также с ее динамикой в процессе лечения. Реакция системного воспаления является одним из наиболее частых патофизиологических процессов, сопровождаемых заметными изменениями уровня внДНК в плазме крови. Ранее было установлено, что уровень внДНК в плазме больных с РА, тесно связанным со сдвигом баланса хелперов в Th1-сторону, является адекватным показателем интенсивности воспалительных процессов и эффективности терапии. В то же время количество работ, исследовавших изменения уровня внДНК в патологических процессах с преобладанием Th2-лимфоцитов весьма ограничено. Несомненный интерес представляет патогенез бронхиальной астмы (БА) по общепринятым представлениям, критически зависящий от продукции специфических антител, контролируемой активированными Th2-лимфоцитам. Цель работы: исследование уровня внДНК в крови и сопоставление его изменения с интенсивностью нетоза и воспалительного процесса с клинической картиной у пациентов с БА. В исследование были включены 20 пациентов с БА, находившиеся на стационарном лечении в аллергологическом отделении клиники иммунопатологии НИИФКИ (г. Новосибирск) и 10 условно здоровых доноров. Показано, что при поступлении в клинику, уровень внДНК у пациентов с БА был существенно снижен по сравнению с контрольной группой условно здоровых доноров. После курса терапии средний уровень внДНК в плазме больных заметно возростал и статистически достоверно не отличался от этого показателя в контроле. Данные других параметров свидетельствуют о том, что пациенты с БА не обнаруживают проявлений выраженной системной воспалительной реакции. Видимо, следует

Адрес для переписки:

*Гаврилова Елена Давидовна
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
фундаментальной и клинической иммунологии»
630099, Россия, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14.
Тел.: 8 (383) 222-04-38.
Факс: 8 (383) 222-70-28.
E-mail: edav.gavr@mail.ru*

Address for correspondence:

*Elena D. Gavrilova
Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology
14 Yadrintsevskaya St
Novosibirsk
630099 Russian Federation
Phone: +7 (383) 222-04-38.
Fax: +7 (383) 222-70-28.
E-mail: edav.gavr@mail.ru*

Образец цитирования:

*Е.Д. Гаврилова, Е.В. Гойман, Е.Н. Демченко,
Д.В. Демина, Н.Н. Вольский, В.А. Козлов «Особенности
изменения уровня внеклеточной ДНК, показателей
нетоза и воспаления в периферической крови
у пациентов с бронхиальной астмой» // Российский
иммунологический журнал, 2023. Т. 26, № 4. С. 533-540.
doi: 10.46235/1028-7221-13925-CCO*

*© Гаврилова Е.Д. и соавт., 2023
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0*

For citation:

*E.D. Gavrilova, E.V. Goiman, E.N. Demchenko, D.V. Demina,
N.N. Volskiy, V.A. Kozlov "Characteristic changes
of extracellular dna levels, indices of netosis and inflammation
in peripheral blood in patients with asthma", Russian Journal
of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskiy Zhurnal, 2023,
Vol. 26, no. 4, pp. 533-540.
doi: 10.46235/1028-7221-13925-CCO*

*© Gavrilova E.D. et al., 2023
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.46235/1028-7221-13925-CCO*

предположить, что, наблюдаемые изменения уровня внДНК в плазме крови при БА, не обусловлены хроническим воспалительным процессом в легких этих больных, а определяются некими иными патофизиологическими механизмами. Определение степени активации нейтрофилов при БА показало, что величина ответа на экзогенный стимул, отражающая примированность нейтрофилов, достоверно увеличена по сравнению с этими показателями в контрольной группе, что хорошо согласуется с современными представлениями о роли нейтрофилов в патогенезе БА.

Ключевые слова: внеклеточная ДНК, бронхиальная астма, Th1/Th2-баланс, воспаление, провоспалительные цитокины

CHARACTERISTIC CHANGES OF EXTRACELLULAR DNA LEVELS, INDICES OF NETOSIS AND INFLAMMATION IN PERIPHERAL BLOOD IN PATIENTS WITH ASTHMA

Gavrilova E.D., Goiman E.V., Demchenko E.N., Demina D.V., Volskiy N.N., Kozlov V.A.

Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Abstract. Many studies have shown that the level of cell-free DNA (cfDNA) in blood of patients with oncological diseases, sepsis, systemic lupus erythematosus, and some rheumatic diseases significantly exceeds the value of similar index in healthy donors and is closely related to the clinical features of the disease. Systemic inflammatory response is among the most frequent pathophysiological processes along with markedly changed levels of cfDNA in blood plasma. The levels of cfDNA in blood plasma of patients with RA are shown to be closely associated with a shifted balance of helpers to the Th1-side. It is an adequate intensity index of inflammatory processes and effectiveness of therapy. At the same time, there only limited number of works concerning changes in cfDNA levels in pathological processes with predominance of Th2 lymphocytes. According to generally accepted concept, the pathogenesis of bronchial asthma is of distinct interest, being critically dependent on the production of specific antibodies controlled by activated Th2 lymphocytes. The aim of this work was to study the level of cfDNA in blood and compare its changes with intensity of NETs and inflammation in patients with asthma. The study included 20 patients with asthma, who underwent hospital treatment at the Department Allergology (Clinic of Immunopathology, RIFCI, Novosibirsk), and 10 conditionally healthy donors. We have shown that, upon admission to the clinic, the level of cfDNA in patients with asthma was significantly reduced against the control group of healthy donors. After a course of therapy, the average level of cfDNA in patients' plasma was increased and did not differ statistically significantly from this index in controls. The data obtained for other parameters indicate that the patients with asthma did not reveal any signs of pronounced systemic inflammatory response. One should suggest that the observed changes in the level of cfDNA in blood plasma in bronchial asthma are not caused by chronic inflammatory process in lungs of these patients, but they are determined by some other pathophysiological mechanisms. It has been shown that the level of *in vitro* stimulated NETs in patients with asthma is higher than in healthy donors, thus being consistent with current opinions on the role of neutrophils in pathogenesis of asthma.

Keywords: extracellular DNA, asthma, Th1/Th2 balance, inflammation, pro-inflammatory cytokines

Введение

В последние два десятилетия появилось достаточно много экспериментальных и клинических исследований, убедительно свидетельствующих о том, что содержание внеклеточной ДНК (внДНК) в плазме крови существенно изменяется при определенных патологических процессах и что этот показатель может быть использован

как один из диагностических критериев в клинической практике. Наибольшее внимание исследователей, с этой точки зрения, было уделено таким социально значимым нозологиям, как онкологические заболевания, сепсис, осложнения при беременности и некоторые другие заболевания, в том числе и те, основой развития которых предполагаются патологические реакции иммунной системы [3, 6]. Наиболее детально было за

эти годы изучено поведение обсуждаемого параметра при иммунопатологических процессах, играющих ключевые роли в развитии системной красной волчанки (СКВ) и ревматоидного артрита (РА). Во многих работах было показано, что уровень внДНК в крови пациентов с этими заболеваниями существенно превышает величину аналогичного показателя у здоровых лиц, использованных в качестве контроля, и достаточно тесно связан с клинической картиной заболевания, а также с ее динамикой в процессе лечения [6, 7, 9, 14].

Согласно работам, базирующимся на клинических данных, одним из наиболее частых патофизиологических процессов, сопровождаемых заметными изменениями уровня внДНК в плазме крови, можно считать системную реакцию воспаления [5, 12]. Ранее на экспериментальной модели нами было показано, что острый воспалительный ответ на экзогенный стимул (введение умеренной дозы ЛПС) приводит к закономерным изменениям содержания внДНК в крови подопытных животных [2], а в лабораторном обследовании пациентов с РА было установлено, что уровень внДНК в плазме является адекватным показателем интенсивности воспалительных процессов у индивидуальных больных и степени эффективности терапии, достаточно тесно коррелируя с общепринятыми клиническими критериями динамики воспалительных реакций при данном заболевании (DAS-28 и СРБ) [1].

Поскольку тяжесть проявлений болезни при РА определяется в основном выраженностью воспалительных изменений в суставах и, следовательно, тесно связана со сдвигом баланса хелперов в Th1-сторону, в то время как патогенез БА, по общепринятым представлениям, критически зависит от продукции специфических антител, контролируемой активированными Th2-лимфоцитами, представляет несомненный интерес исследовать уровень внДНК в крови больных БА и сопоставить его значения с другими лабораторными показателями и с клинической картиной болезни. Это и стало **целью настоящей работы**.

Материалы и методы

Характеристика пациентов

В данную работу были включены 20 пациентов с бронхиальной астмой (БА), находившиеся на стационарном лечении в аллергологическом отделении клиники иммунопатологии НИИФ-КИ (г. Новосибирск). Право на участие в исследовании подтверждалось письменным инфор-

мированным согласием. Протокол обследования был одобрен локальным этическим комитетом.

Исследованная группа состояла из 12 женщин (60%) и 8 мужчин (40%) в возрасте от 27 до 59 лет. По длительности заболевания от 1 года до 40 лет. Забор крови производился двукратно: в момент поступления и через 10 дней со дня госпитализации.

В исследование включены 10 образцов от условно здоровых доноров, набранных на Пункте забора донорской крови ГКБ № 1 г. Новосибирска.

Методы исследования

Выделение внеклеточной ДНК

Забор периферической крови для проведения анализа осуществлялся с помощью венозной пункции в вакуумную пробирку с антикоагулянтом (ЭДТА).

Плазму отделяли от форменных элементов центрифугированием при 400 g в течение 20 мин [11]. Выделение внеклеточной ДНК из плазмы проводили на колонках компании «Био-Силика» (г. Новосибирск) согласно инструкции по применению «Набора для выделения ДНК из плазмы крови». Для определения внДНК, связанной с клеточной поверхностью, клетки инкубировали 5 мин с 0,25%-ным раствором трипсина, реакцию останавливали добавлением ингибитора трипсина из соевых бобов (Sigma, США) и центрифугированием отделяли супернатант, содержащий внДНК. Определение ДНК проводили с помощью флуоресцентного красителя PicoGreen (Invitrogen). Концентрация ДНК пересчитывалась по калибровочной кривой, построенной для известных концентраций стандартной двуцепочечной λ ДНК.

Выделение нейтрофилов

Периферическую кровь у доноров и пациентов с ревматоидным артритом забирали в утренние часы натощак в пропиленовые пробирки с гепарином (20 МЕ/мл крови). Нейтрофилы выделяли с помощью центрифугирования в двойном градиенте плотности фиколл-урографин ($\rho = 1,077$ г/см³ и $\rho = 1,119$ г/см³) при 400 g 25 мин. Полученное кольцо нейтрофилов переносили в пробирки и трижды отмывали в 5 мл PBS, центрифугируя при 200 g 10 минут, а затем ресуспендировали в культуральной среде, включающей RPMI-1640 без фенолового красного с добавлением 1%-ной инактивированной эмбриональной телячьей сыворотки. Нейтрофильные лейкоциты составляли более 98% во фракции выделенных клеток, а их жизнеспособность составляла 99%, что определялось тестом с трипановым синим.

Определение спонтанного и стимулированного нетоза нейтрофилов *in vitro*

Свежевыделенные нейтрофилы переносили в черный планшет в концентрации 2×10^5 клеток на лунку и часть из них стимулировали добавлением форболмирикат-ацетата (Sigma-Aldrich, Франция) до концентрации 50 нМ, с последующим культивированием при 37 °С в атмосфере 5% CO₂ в течение 3 часов. Затем в лунки вносили 5 мМ Sytox Green (Invitrogen, США). Уровень флюоресценции регистрировали на ридере Tristar™ LB941 BERTHOLD (Германия): длина волны возбуждения – 485 нм и длина волны излучения – 527 нм [4].

Определение миелопероксидазы

Концентрацию миелопероксидазы определяли иммуноферментным методом с помощью набора Human MPO ELISA kit (Hycult Biotech, Нидерланды).

Определение цитокинов

IL-8, IL-1β, TNFα в сыворотке крови определяли с помощью наборов АО «Вектор-Бест»

(г. Новосибирск), предназначенных для иммуноферментного анализа.

Статистическая обработка

Результаты в таблицах приведены в виде средних величин. Достоверность выявленных различий и величину связей между измеренными параметрами оценивали методами непараметрической статистики с использованием U-критерия Манна–Уитни, T-критерия Вилкоксона и коэффициента ранговой корреляции Спирмена.

Результаты и обсуждение

Измерение вДНК в плазме крови пациентов с БА показало, что величина этого параметра в момент госпитализации была существенно снижена по сравнению с контрольной группой условно здоровых доноров (табл. 1, верхняя строка, $p < 0,05$). Однако после интенсивного курса терапии средний уровень вДНК в плазме больных

ТАБЛИЦА 1. ВНЕКЛЕТОЧНАЯ ДНК, ПОКАЗАТЕЛИ НЕТОЗА И ИЗМЕНЕНИЕ ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ В КРОВИ У ПАЦИЕНТОВ С БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ

TABLE 1. EXTRACELLULAR DNA, INDICATORS OF NETOSIS AND CHANGES OF PRO-INFLAMMATORY CYTOKINES IN THE BLOOD OF PATIENTS WITH ASTHMA

Параметры Parameters	Доноры Donors	Пациенты с астмой Patients with asthma	
		До лечения Before treatment	После лечения After treatment
вДНК, нг/мл cfDNA, ng/mL	2,39	0,87 (0,05)	2,63
Нетоз спонтанный Spontaneous netosis	961759	993033 (0,85)	1019155 (0,97)
Нетоз при стимуляции Netosis on stimulation	1422891	2180530 (0,0006)	1654284 (0,33)
Индекс стимуляции Stimulation Index	1,39	2,25 (0,000005)	1,61 (0,015)
Миелопероксидаза, нг/мл Myeloperoxidase, ng/mL	13,13	30,23 (0,0005)	36,25 (0,0004)
СРБ, мг/л CRP, mg/L	2,50	5,28	–
TNFα, пг/мл TNFα, pg/mL	0,69	3,32 (0,004)	0,93 (0,43)
IL-1β, пг/мл IL-1β, pg/mL	1,90	4,28 (0,14)	3,12 (0,25)
IL-8, пг/мл IL-8, pg/mL	3,31	6,33 (0,23)	6,71 (0,20)

Примечание. Полужирным шрифтом выделены достоверные различия с донорами (значения p приведены в скобках).

Note. Significant differences from donors are highlighted in bold (p values are in brackets).

заметно возрастал и статистически достоверно не отличался от этого показателя в контроле.

Полученные нами результаты оказались совершенно неожиданными, поскольку в подавляющем большинстве исследований, описывающих изменения содержания внДНК в крови больных с самыми различными патологиями, указывается на существенное увеличение этого параметра по сравнению со здоровыми лицами, а данных, говорящих о его снижении при каких-либо воздействиях, в литературе найти не удалось. К сожалению, вопрос об уровне внДНК в крови при БА еще недостаточно изучен, и мы нашли лишь две опубликованные работы, в которых приведены результаты непосредственного измерения этого параметра у больных с БА. В первой не было обнаружено статистически достоверных изменений

содержания внДНК при БА [10], в то время как в работе группы исследователей из Неаполя [13] было зарегистрировано небольшое повышение (на 5-10% по сравнению с контролем) данного показателя у пациентов с БА. Однако этот вывод об увеличении количества внДНК в крови больных вызывает определенные сомнения, поскольку указанный в цитируемой работе уровень внДНК у здоровых лиц (2,2 мкг/мл) более чем на два порядка превышает аналогичные данные в опубликованных работах других авторов. Следует полагать, что на сегодняшний день вопрос об уровне внДНК в крови пациентов с БА еще окончательно не прояснен и требует дальнейшего изучения и проверки.

Как уже отмечалось выше, содержание внДНК в крови изменяется при воспалитель-

ТАБЛИЦА 2. ИССЛЕДОВАННЫЕ ПАРАМЕТРЫ У БОЛЬНЫХ С РАЗЛИЧНЫМИ ФЕНОТИПИЧЕСКИМИ ФОРМАМИ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЫ

TABLE 2. STUDIED PARAMETERS IN PATIENTS WITH DIFFERENT PHENOTYPIC FORMS OF ASTHMA

Параметры Parameters	Фенотипические формы БА Phenotypic form of asthma		
	Экзогенная Exogenic (n = 7)	Смешанная Mixed (n = 8)	Эндогенная Endogenic (n = 5)
внДНК, нг/мл cfDNA, ng/mL	0,88	0,97	0,72
Связанная с поверхностью клетки внДНК, нг/мл Cell-surface-bound DNA, ng/mL	10,86	19,08	31,95
Нетоз при стимуляции Netosis on stimulation	2358146	2132084	2009382
Индекс стимуляции Stimulation Index	2,46	2,09	2,20
Миелопероксидаза, нг/мл Myeloperoxidase, ng/mL	28,86	36,00	23,50
Базофилы, % Basophils, %	0,57	0,25	0,00
Эозинофилы, % Eosinophils, %	4,71	2,63	1,80
Индекс N/L Index NRL	2,65	5,77	5,32
СРБ, мг/л CRP, mg/L	2,74	5,36	8,70
TNF α , пг/мл TNF α , pg/mL	2,41	4,15	4,85
IL-1 β , пг/мл IL-1 β , pg/mL	3,23	5,97	4,60
IL-8, пг/мл IL-8, pg/mL	5,20	8,72	5,50

ных реакциях в организме, и, по общепринятым представлениям, значительная часть этой ДНК может появляться в крови вследствие выхода во внеклеточное пространство при нетозе нейтрофильных лейкоцитов. Поэтому в нашем исследовании была дополнительно изучена способность нейтрофилов из периферической крови больных БА реагировать *in vitro* реакцией нетоза на экзогенный стимул (форболмиристан ацетат) и содержание миелопероксидазы в крови больных (специфический показатель интенсивности нетоза *in vivo*), а также определены концентрация С-реактивного белка (СРБ) и содержание провоспалительных цитокинов в крови. Результаты этих измерений представлены в таблице 1 и свидетельствуют, что больные БА (рассматриваемые как единая группа), не обнаруживают проявлений выраженной системной воспалительной реакции. Средний уровень СРБ у них практически не выходит за границы нормальных значений этого показателя, а содержание в крови провоспалительных цитокинов лишь умеренно повышено у них по сравнению с контрольной группой, и только уровень TNF α достоверно отличается от контроля. При этом уровень внДНК в плазме крови у индивидуальных больных не коррелирует ни с одним из измеренных цитокинов, ни с СРБ (коэффициенты ранговой корреляции для этих параметров близки к нулю). Исходя из полученных результатов, резонно предполагать, что наблюдаемые изменения уровня внДНК в плазме крови при БА не обусловлены хроническим воспалительным процессом в легких этих больных, а определяются некими иными патофизиологическими механизмами, природу и значение которых еще предстоит выяснить.

К несколько иному выводу приводят результаты определения степени активации нейтрофилов при БА. Хотя уровень спонтанного нетоза *in vitro* пациентов с БА и не отличался от величины этого параметра в контроле, примированность нейтрофилов из их периферической крови (т. е. величина ответа на экзогенный стимул) была достоверно увеличена по сравнению с этими показателями в контрольной группе. Этот факт хорошо согласуется с современными представлениями о роли нейтрофилов в патогенезе БА. При этом не обнаружено существенной корреляции между активностью нейтрофильных лейкоцитов и уровнем внДНК в плазме. Высокое содержание миелопероксидазы в крови больных БА прямо свидетельствует об активно происходящем нетозе нейтрофилов, но роль этого процесса в изменении уровня внДНК в плазме не очевидна, и

значимой корреляции между этими параметрами не обнаруживается ($\rho = 0,28, p > 0,05$).

Ввиду уже отмеченной этиопатогенетической разнородности состояний у пациентов с бронхиальной астмой, нами была предпринята попытка сравнить средние величины измеренных параметров между фенотипическими формами БА, выделяемыми в клинике НИИФКИ на основании имеющихся клинических и лабораторных данных. Результаты такого сравнения даны в таблице 2.

Видно, что, если показатели активации и нетоза нейтрофилов не обнаруживают заметных межгрупповых различий, то содержание в крови базофильных и эозинофильных гранулоцитов, закономерно возрастающее при аллергических реакциях, оказывается наибольшим при экзогенной фенотипической форме БА, патогенез которой определяется аллергизацией в ответ на антигены, поступающие в организм из внешней среды. Хорошо согласуется с выделением этих клинических форм и тот факт, что относительно повышенные значения показателей воспалительной активности (СРБ, TNF α) выявляются у больных с эндогенной фенотипической формой БА, для которой характерно развитие хронического воспалительного процесса в дыхательных путях, в то время как в группе с экзогенной формой величина этих показателей минимальна. Это же можно заметить и относительно индекса N/L (т. е. соотношения между количеством нейтрофилов и лимфоцитов в периферической крови), который в последние годы все чаще используется в качестве диагностического критерия воспалительной активности [8]. К сожалению, малые размеры выделенных групп не позволяют говорить о достоверности наблюдаемых межгрупповых различий, однако явная закономерность вариации не одного, а одновременно многих параметров дает почти полную уверенность в реальном существовании различий по исследованным признакам между клиническими формами БА.

В связи с этим приобретает определенное значение тот любопытный факт, что, хотя по содержанию внДНК в плазме крови указанные группы практически не отличаются друг от друга, величина трипсиновой фракции внДНК (т. е. количество внДНК, ковалентно связанной с мембранами клеток крови и высвобождаемой в раствор только после кратковременной обработки трипсином) оказывается максимальной у больных с эндогенной формой БА и минимальной в группе с экзогенной фенотипической формой. Особый интерес наблюдаемому феномену придает видимое сочетание относительно большой

величины трипсиновой фракции внДНК с относительно увеличенными показателями воспалительной активности при эндогенной форме БА. На первый взгляд, это противоречит экспериментальным данным, полученным нами ранее [9], так как в этих экспериментах острая воспалительная реакция приводила не к увеличению, а к существенному уменьшению трипсиновой фракции. Можно предполагать, что такое «нелогичное» поведение внДНК у больных БА еще раз указывает на специфичность регуляции этого параметра при развитии данного заболевания.

Заключение

В заключение следует подчеркнуть, что обнаруженное в данном исследовании уменьшение содержания внДНК в плазме крови у пациентов с БА является единственным – на сегодняшний день – зафиксированным случаем угнетающего эффекта патологического процесса на этот параметр. Сущность такого воздействия еще не выяснена, но можно надеяться, что дальнейшие исследования позволят расшифровать физиологические механизмы, приводящие к возникновению подобных феноменов.

Список литературы / References

1. Гаврилова Е.Д., Демченко Е.Н., Гойман Е.В., Чумасова О.А., Вольский Н.Н., Сизиков А.Э., Козлов В.А. Внеклеточная ДНК в плазме крови и активность нейтрофильных лейкоцитов у пациентов с ревматоидным артритом // Российский иммунологический журнал, 2022. Т. 25, № 2. С. 147-154. [Gavrilova E.D., Demchenko E.N., Goiman E.V., Chumasova O.A., Volsky N.N., Sizikov A.E., Kozlov V.A. Plasma extracellular DNA and neutrophilic leukocyte activity in patients with rheumatoid arthritis. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2022, Vol. 25, no. 2, pp. 147-154. (In Russ.)] doi: 10.46235/1028-7221-1110-PED.
2. Демченко Е.Н., Гаврилова Е.Д., Гойман Е.В., Вольский Н.Н., Колесникова О.П., Козлов В.А. Внеклеточная ДНК в крови как показатель воспалительной реакции *in vivo* // Медицинская иммунология, 2022. Т. 24, № 4. С. 853-860. [Demchenko E.N., Gavrilova E.D., Goiman E.V., Volsky N.N., Kolesnikova O.P., Kozlov V.A. Extracellular DNA in blood: an index of *in vivo* inflammatory response. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2022, Vol. 24, no. 4, pp. 853-860. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-EDI-2504.
3. Козлов В.А. Свободная внеклеточная ДНК в норме и при патологии // Медицинская иммунология, 2013. Т. 15, № 5. С. 399-412. [Kozlov V.A. Free extracellular DNA in normal state and under pathological conditions. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2013, Vol. 15, no. 5, pp. 399-412. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2013-5-399-412.
4. Barrientos L., Marin-Esteban V., Chaisemartin L., Lievin Le-Moal V., Sandre C., Bianchini E., Nicolas V., Pallardy M., Chollet-Martin S. An improved strategy to recover large fragments of functional human neutrophil extracellular traps. *Front. Immunol.*, 2013, Vol. 4, 166. doi: 10.3389/fimmu.2013.00166.
5. Chornenki N.L.J., Coke R., Kwong A.C., Dwivedi D.J., Xu M.K., McDonald E., Marshall J.C., Fox-Robichaud A.E., Charbonney E., Liaw P.C. Comparison of the source and prognostic utility of cfDNA in trauma and sepsis. *Intensive Care Med. Exp.*, 2019, Vol. 7, no. 1, pp. 29-38.
6. Duvvuri B., Lood C. Cell-free DNA as a biomarker in autoimmune rheumatic diseases. *Front. Immunol.*, 2019, Vol. 10, 502. doi: 10.3389/fimmu.2019.00502
7. Hashimoto T., Yoshida K., Hashiramoto A., Matsui K. Cell-Free DNA in rheumatoid arthritis. *Int. J. Mol. Sci.*, 2021, Vol. 22, no. 16, 8941. doi: 10.3390/ijms22168941.
8. Huang W.J., Huang G.T., Zhan Q.M., Chen J.L., Luo W.T., Wu L.H., Wu L.Y., Wu L.Y., Lu Z.N., Sun Y.F. The neutrophil to lymphocyte ratio as a novel predictor of asthma and its exacerbation: a systematic review and meta-analysis. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.*, 2020, Vol. 24, no. 22, pp. 11719-11728.
9. Rykova E., Sizikov A., Roggenbuck D., Antonenko O., Bryzgalov L., Morozkin E., Skvortsova K., Vlassov V., Laktionov P., Kozlov V. Circulating DNA in rheumatoid arthritis: pathological changes and association with clinically used serological markers. *Arthritis Res. Ther.*, 2017, Vol. 19, 85. doi: 10.1186/s13075-017-1295-z
10. Szpechcinski A., Chorostowska-Wynimko J., Struniawski R., Kupis W., Rudzinski P., Langfort R., Puscinska E., Bielen P., Sliwinski P., Orłowski T. Cell-free DNA levels in plasma of patients with non-small-cell lung cancer and inflammatory lung disease. *Br. J. Cancer*, 2015, Vol. 113, no. 3, pp. 476-483.
11. Tamkovich S.N., Litviakov N.V., Bryzgunova O.E., Dobrodeev A.Y., Rykova E.Y., Tuzikov S.A., Zav'ialov A.A., Vlassov V.V., Cherdyntseva N.V., Laktionov P.P. Cell-surface-bound circulating DNA as a prognostic factor in lung cancer. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 2008, Vol. 1137, no. 1, pp. 214-217.
12. van der Meer A.J., Kroeze A., Hoogendijk A.J., Soussan A.A., van der Schoot C.E., Willemin W.A., Voermans C., van der Poll T., Zeerleder S. Systemic inflammation induces release of cell-free DNA from hematopoietic and parenchymal cells in mice and humans. *Blood Adv.*, 2019, Vol. 3, no. 5, pp. 724-728.

13. Varricchi G., Modestino L., Poto R., Cristinziano L., Gentile L., Postiglione L., Spadaro G., Galdiero M.R. Neutrophil extracellular traps and neutrophil-derived mediators as possible biomarkers in bronchial asthma. *Clin. Exp. Med.*, 2022, Vol. 22, no. 2, pp. 285-300.

14. Zhang S., Lu X., Shu X., Tian X., Yang H., Yang W., Zhang Y., Wang G. Elevated plasma cfDNA may be associated with active lupus nephritis and partially attributed to abnormal regulation of neutrophil extracellular traps (NETs) in patients with systemic lupus erythematosus. *Intern. Med.*, 2014, Vol. 5, no. 24, pp. 2763-2771.

Авторы:

Гаврилова Е.Д. — к.б.н., заведующая лабораторией экспериментальной иммунотерапии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Гойман Е.В. — к.м.н., научный сотрудник лаборатории экспериментальной иммунотерапии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Демченко Е.Н. — к.х.н., научный сотрудник лаборатории экспериментальной иммунотерапии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Демина Д.В. — к.м.н., заведующая аллергологическим отделением, клиника иммунопатологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Вольский Н.Н. — к.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории экспериментальной иммунотерапии 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

Authors:

Gavrilova E.D., PhD (Biology), Head, Laboratory of Experimental Immunotherapy, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation;

Goiman E.V., PhD (Medicine), Research Associate, Laboratory of Experimental Immunotherapy, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Demchenko E.N., PhD (Chemistry), Research Associate, Laboratory of Experimental Immunotherapy, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Demina D.V., PhD (Medicine), Head, Department of Allergology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Volskiy N.N., PhD (Medicine), Leading Research Associate, Laboratory of Experimental Immunotherapy, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Kozlov V.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Full Member, Russian Academy of Sciences, Research Director, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Поступила 10.07.2023
Принята к печати 12.07.2023

Received 10.07.2023
Accepted 12.07.2023

СОПУТСТВУЮЩИЕ ИНФЕКЦИИ У ДЕТЕЙ С АЛЛЕРГОПАТОЛОГИЕЙ В КАЛИНИНГРАДСКОЙ ОБЛАСТИ

Мархайчук А.З.¹, Плешкова А.О.², Мун А.Ч.², Гончаров А.Г.²

¹ ГБУЗ «Детская областная больница Калининградской области» Министерства здравоохранения Калининградской области, г. Калининград, Россия

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

Резюме. Целью исследования было изучить структуру и распространенность инфекционного синдрома у детей с аллергопатологией средней и тяжелой степени тяжести в Калининградской области с комплексным проявлением аллергических реакций как на коже, так и на слизистых пищеварительного и респираторного тракта.

Клинически, объективно и лабораторно было обследовано и включено в исследуемую группу 90 детей от 0 до 18 лет с разнообразными симптомами аллергопатологии. Тяжесть течения была связана с выраженностью и длительностью симптомов, а также с частыми бактериальными и бактериально-грибковыми осложнениями, с нарушением качества жизни и ночного сна. Дети были проконсультированы оториноларингологом, гематологом, пульмонологом, хирургом, офтальмологом, инфекционистом, эндокринологом, кардиологом. Диагнозы по нозологическим формам производились согласно актуальным клиническим рекомендациям Министерства здравоохранения Российской Федерации. В данной статье приведены данные о сопутствующей инфекционной патологии, ее влияние на общее состояние и тяжесть течения гиперчувствительности.

В среднем возраст манифестации аллергопатологии у детей составил $3,12 \pm 2,72$ года. Средняя длительность течения заболевания в наблюдаемой группе составила $7,5 \pm 0,88$ года. В группе численность мальчиков преобладала ($n = 56$) в 1,6 раза.

Отягощенную наследственность отмечали не более 15% родителей пациентов, однако при тщательном сборе анамнеза, в динамическом наблюдении детей отягощенная наследственность была выявлена со стороны матери у 45,56% ($n = 41$), со стороны отца 31,1% ($n = 28$). У 8 детей оба родителя сами страдали аллергопатологией, у родных брата/сестры у 21,1% ($n = 19$) обследованных детей. В роду, с учетом бабушек и дедушек, аллергопатология была у 56 (62,2%).

Практически все пациенты имели нарушение носового дыхания, у 77 (85,6%) детей с гипертрофией аденоидов отмечалась привычка дышать через рот. Синдром постназального затекания был установлен в 78 случаях. Как видно, аллергический ринит с гипертрофией аденоидов, как правило

Адрес для переписки:

Мархайчук Айшат Зиябутдиновна
ГБУЗ «Детская областная больница Калининградской области» Министерства здравоохранения Калининградской области
236044, Россия, г. Калининград, ул. Л. Шевцовой, 60, кв. 1.
Тел.: 8 (905) 246-42-14.
E-mail: ayshat.90@rambler.ru

Address for correspondence:

Aishat Z. Markhaychuk
Children's Regional Hospital
60 L. Shevtsova St, Apt 1
Kaliningrad
236044 Russian Federation
Phone: +7 (905) 246-42-14.
E-mail: ayshat.90@rambler.ru

Образец цитирования:

А.З. Мархайчук, А.О. Плешкова, А.Ч. Мун, А.Г. Гончаров «Сопутствующие инфекции у детей с аллергопатологией в Калининградской области» // Российский иммунологический журнал, 2023, Т. 26, № 4. С. 541-546.
doi: 10.46235/1028-7221-13986-CII

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

For citation:

A.Z. Markhaychuk, A.O. Pleshkova, A.Ch. Mun, A.G. Goncharov "Concomitant infections in children with allergic pathology in the Kaliningrad Region", Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskiy Zhurnal, 2023, Vol. 26, no. 4, pp. 541-546.
doi: 10.46235/1028-7221-13986-CII

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

DOI: 10.46235/1028-7221-13986-CII

дают клинику постназального затекания, чем могут провоцировать аспирационные бронхиты и пневмонии, особенно при носительстве патогенной или условно-патогенной флоры в носовой полости и/или в зева.

Выводы: 1. Выявление и санация хронических очагов инфекции, бактериальной, грибковой является необходимой составляющей персонифицированной терапии аллергопатологии у детей. 2. При рецидивирующем высевании патогенной флоры (йодофильной флоры, грибов, кокковой флоры) в копрограмме должны исключать не только транзиторную лактазную недостаточность, но и врожденную лактазную недостаточность, что позволит предупредить развитие в дальнейшем энтероколита и обострение не только кожного статуса, но и респираторных проявлений. 3. При тяжелом течении респираторных вирусных инфекций у детей в период адаптации к детским дошкольным учреждениям в течение адаптационного периода необходимо исключить сенсibilизацию к аллергенам клещей, домашней пыли и эпидермальным аллергенам домашних животных. 4. Комплексный и персонифицированный подход к диагностике аллергопатологии и комобридных состояний позволяет сформировать условия для стойкой ремиссии, делая возможным проведение аллергенспецифической иммунотерапии, что в перспективе оказывает на болезнь модифицирующее влияние на гиперреактивность наших пациентов.

Ключевые слова: аллергопатология, аллергический ринит, инфекционные осложнения, структура, распространенность

CONCOMITANT INFECTIONS IN CHILDREN WITH ALLERGIC PATHOLOGY IN THE KALININGRAD REGION

Markhaychuk A.Z., Pleshkova A.O., Mun A.Ch., Goncharov A.G.

^a Children's Regional Hospital of the Kaliningrad Region, Kaliningrad, Russian Federation

^b Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation

Abstract. The aim of our work was to study the structure and prevalence of the infectious syndrome in children from Kaliningrad Region with moderate-to-severe allergic pathology, with a complex manifestations of allergic reactions, both on skin and on the mucous membranes of the digestive and respiratory tract.

Ninety children from 0 to 18 years old with various symptoms of allergic pathology were examined and included in the study group using standard clinical, objective and laboratory criteria. The severity of clinical course was associated with the severe and long-lasting symptoms, as well as with frequent bacterial and bacterial-fungal complications, with impaired quality of life and night sleep. The children were consulted by the specialists in otorhinolaryngology, hematology, pulmonology, surgery, ophthalmology, infectology, endocrinology, cardiology. Diagnoses according to nosological forms were made in accordance with the current clinical recommendations of Russian Ministry of Health. Our article presents data on concomitant infectious diseases and their impact on general condition and severity of hypersensitive responses. The average age of allergic manifestations in the group of children was 3.12 ± 2.72 years. The average duration of the disease in the observed group was 7.5 ± 0.88 years. The number of boys in our group prevailed ($n = 56$) by 1.6 times. Complicated heredity factors were reported by $< 15\%$ of the patients' parents. However, with careful collection of medical history taking, upon dynamic observation, the aggravated heredity on the mother's side was detected in 45.56% ($n = 41$), and on the father's side, in 31.1% of cases ($n = 28$). In eight families, both parents suffered from allergic pathology, in siblings, 21.1% ($n = 19$) of the examined children had allergies. In the families, including grandparents, allergic pathology was reported in 56 cases (62.2%).

Almost all patients had problems with nasal breathing, 77 (85.6%) children with adenoid hypertrophy had a habit of breathing through the mouth. Postnasal drip syndrome was found in 78 cases. Allergic rhinitis with adenoid hypertrophy is, generally, accompanied by postnasal leakage, which can provoke aspiration bronchitis and pneumonia, especially if pathogenic or opportunistic flora is transferred to the nasal cavity and/or to the pharynx.

Conclusions: 1. Identification and rehabilitation of chronic foci of infection, bacterial, fungal, should be a necessary component of the personalized therapy of allergic pathology in children. 2. In cases of recurrent sowing

or finding of pathogenic flora (iodophilic flora, fungi, coccal flora) in the coprogram, one should exclude not only transient lactase deficiency, but also congenital lactase deficiency, thus preventing development of enterocolitis in the future like as worsening of skin status and respiratory manifestations. 3. In case of severe respiratory viral infections in children during the period of adaptation for pre-school institutions, one should exclude sensitization to allergens of house dust mites and epidermal allergens of domestic animals. 4. A comprehensive and personalized approach to the diagnosis of allergic disorders and comorbid conditions enables us to create conditions for stable remission, making it possible to conduct allergen-specific immunotherapy, which may provide a disease-modifying effect upon the hyperreactive states in our patients.

Keywords: allergic diseases, allergic rhinitis, infectious complications, structure, incidence

Введение

Аллергопатология, в основе которой лежат реакции гиперчувствительности, проявляется не только сенсбилизацией к специфическим антигенам, но и повышенной чувствительностью к агентам инфекционной природы [1, 3]. Инфекции всегда отягощают течение аллергопатологии, кроме того снижается эффективность топической терапии, создавая необходимость расширять объем фармакотерапии [2]. В практике врача – аллерголога-иммунолога хронические инфекционные процессы, такие как паразитозы, носительство патогенной флоры явление нередкое. Зачастую провести дифференциальный диагноз аллергопатологии тяжелого персистирующего течения с вирусно-бактериальным процессом не представляется возможным без вспомогательных средств диагностики. Поэтому **целью нашего исследования** было изучить структуру и распространенность инфекционного синдрома у детей с аллергопатологией средне-тяжелой степени тяжести в Калининградской области с комплексным проявлением аллергических реакций.

Материалы и методы

В группу исследования вошло 90 детей возрастом от 0 до 18 лет, средний возраст группы $10 \pm 3,6$ года, у которых наблюдается среднее или средне-тяжелое течение инфекционно-аллергического синдрома на коже, в желудочно-кишечном и респираторном трактах. Аллергологическое обследование группы детей проводилось на базе консультативно-диагностического центра для детей ГБУЗ КО «Детская областная больница Калининградской области», а инфекционное и лабораторное обследование по месту жительства. Диагноз «аллергический ринит» выставлялся на основании федеральных клинических рекомендаций [1, 3, 4]. Дети со стоматитами, у которых были подтверждены врожденные ошибки иммунитета были исключены из группы. Все дети были об-

следованы: общий клинический анализ крови, кал на яйца глист, копрограмма, риноцитограмма, посевы из зева и носа на аэробную и анаэробную патогенную и условно-патогенную флору с определением чувствительности к антибиотикам [5], иммуноглобулины сыворотки крови IgG, IgM, IgA, IgE. Детям с увеличенными лимфоузлами рекомендовалось обследование на выявление носительства вируса Эпштейна–Барра, цитомегаловируса, оценивался показатель перенесенной стрептококковой инфекции (АСЛ-О). У детей с жалобами на астенизацию исключали дефицит витамина Д, латентный железодефицит и йододефицит. Назначались консультации узких специалистов: оториноларинголога, эндокринолога, гематолога, кардиолога, хирурга. Для диагностики методом скарификационных кожных проб (СКП) использовались следующие аллергены компании «Микроген»: аллерген пыльцы березы, ясеня, клена, ольхи, орешника, тимopheвки луговой и др. В ходе консультации детально был собран аллергологический и инфекционный анамнез.

Результаты и обсуждение

На консультативном приеме причиной обращений были жалобы на заложенность носа ($n = 86$; 95,56%), кашель (ассоциированный с синдромом постназального затекания, $n = 78$; 86,67%), эпизоды дистанционных свистящих хрипов ($n = 43$; 47,78%), увеличение аденоидных вегетаций (храп, сопение, дыхание через рот, $n = 39$; 55,7%). В среднем возраст манифестации аллергопатологии у детей составил $3,12 \pm 2,72$ года. Средняя длительность течения заболевания в наблюдаемой группе составила $7,5 \pm 0,88$ года. В данной группе преобладало количество мальчиков ($n = 56$; 62%). Как правило, дебют гиперчувствительности был ассоциирован с атопическим дерматитом у 32 детей (35,5%) на первом году жизни. Наиболее частой выявленной жалобой была заложенность носа, встречавшаяся у

всех детей, но, как правило родители, обращали внимание на кашель, из-за синдрома постназального затекания – на первом году жизни был отмечен у 15 (16,67%) пациентов. Отягощенную наследственность отмечали не более 15% родителей пациентов, однако при тщательном сборе анамнеза, в динамическом наблюдении детей отягощенная наследственность была выявлена со стороны матери у 45,56% (n = 41), со стороны отца 31,1% (n = 28). У 8 детей оба родителя сами страдали аллергопатологией, у родных брата/сестры у 21,1% (n = 19) обследованных детей. В роду, с учетом бабушек и дедушек, аллергопатология была у 56 (62,2%).

В результате обследования, у всех детей были выявлены проявления аллергического ринита. Аллергический риноконъюнктивит наблюдался у 36 детей (40%). Сопутствующей патологией, как правило, были гипертрофия аденоидов (n = 77; 85,6%) и глоточных миндалин (n = 41; 45,5%). Рецидивирующие отиты были отмечены у 18 ребят (20%), аденотомия была выполнена у 13 (14,4%), однако, у 1 ребенка повторно диагностирована увеличение аденоидных вегетаций. У 48 детей (53%), при обследовании выделили из носа и ротоглотки следующие инфекции: *Staph. aureus* (n = 13, 14,4%), *Strep. viridans* (n = 7; 7,8%), *Strep. pyogenus* (n = 2; 2,22%), *Moraxella cathar* (n = 6), *Staph. epiderm* (n = 4; 4,4%), *Strep. pneumon.* (n = 4), *Haemph parainf* (n = 3), *Neisseria subflava* (n = 2; 2,22%), *Staph. spp.* (n = 3), *Klebsiella pneumonia* (n = 1; 1,1%), Бета не гемолитический стрептококк группы А (n = 1), коагулазо негативный *Staph. aureus* (n = 1), *Strep aureginsa* (n = 1). Из них у 8 детей выделялись 2 и более представителей патогенной флоры. Грибковая флора (*Candida alb.* или *Candida trop.*) в носовых ходах была у 8 детей (6 и 2 соответственно). Эта группа детей обладали бактериально-грибковыми био-пленками, в результате чего стали резистентными к ингаляционным кортикостероидам. А фармакотерапия системными препаратами вынуждено была расширена для достижения клинического эффекта. Гиперреактивность бронхов на первом году жизни проявилась на фоне вирусной инфекции и/или паллиации у 11 (12,22%) обследованных. Дети переносили в анамнезе пневмонии или бронхопневмонии (n = 24, 26,7%), бронхиты (n = 38, 42,2%), отиты (n = 38, 42,2%). Ввиду получения антибактериальной терапии, симптоматической терапии и использование в дальнейшем курсами антисептических и бактериостатических препаратов – микробиологическое исследование этим детям не производилось. Бронхиальную

астму, совместно с пульмонологом, верифицировали у 15 детей (16,67%).

При активной цитомегаловирусной инфекции (n = 5) и вирус Эпштейна–Барра (n = 6), у детей с хроническим носительством патогенной бактериальной флоры отмечались региональное увеличение и болезненность лимфоузлов (n = 16, 17,78%), редко афтозные стоматиты (n = 2; 2,22%). Вирус *Varicella zoster* перенесли порядка 90% детей на первом-втором году посещения дошкольного образования, на фоне социальной и вирусологической адаптации произошла манифестация аллергопатологии. Также в группу вошли 3 детей, перенесших ветрянку в школьные годы, после чего их аллергосенсибилизация стала клинически значимой. У одного мальчика был реализован дебют бронхиальной астмы, а у одной девочки отмечен однократный эпизод бронхообструктивного синдрома. Вероятно, влияние герпетических вирусов играет значительную роль в реализации клинической картины, за счет истощения противовоспалительных ресурсов организма. Со стороны желудочно-кишечного тракта дети часто страдали запорами (n = 34; 37,78%), гастроэзофагальной рефлюксной болезнью (n = 9; 10%), функциональными расстройствами пищеварения (n = 9; 10%), алиментарным и аллергическим энтероколитом и гастритом (n = 42; 46,67%), верифицированной аллергией на белок коровьего молока (n = 6; 6,67%). У детей с жалобами на вздутие живота, нестабильность стула с младенчества по настоящее время было проведено генотипирование гена, кодирующего фермент лактазу – LCT. В результате обследования полную лактазную недостаточность выявили у 22 (24,4%), частичную – у 11 (12,2%). После чего даны рекомендации по соблюдению безлактозной диеты. На фоне адекватного питания, частота и тяжесть респираторных и желудочно-кишечных проявлений уменьшились. При использовании препаратов бактериальных лизатов, восстановилась резистентность к бактериальной патогенной флоре. В динамике самочувствие этих детей значительно улучшилось – частота обращений к педиатру, гастроэнтерологу, аллергологу-иммунологу сократилась, как и количество пропущенных дней в образовательных учреждениях по причине болезни. Стало возможным проведение аллергенспецифической терапии. Санированы от лямблиоза, аскаридоза и энтеробиоза были 35 детей, 38,89%. Атопический дерматит отмечался в анамнезе у 34 детей (37,78%). Грибково-бактериальный дерматит, как вторичная флора, был в анамнезе у 6 детей. Пityриаз (розовый лишай Жильбера) перенесли 4 детей. Распространенный и упорный

дерматит нередко ассоциировался с дефицитом витамина Д (n = 14; 15,6%). Со стороны крови были выявлены: латентный железодефицит (n = 6), анемия легкой степени тяжести (n = 2), тромбоцитоз (n = 6), тромбоцитопения (n = 11), лейко- и нейтропения транзиторные (n = 2).

Таким образом, после санации хронических очагов инфекции, повысилась эффективность топических кортикостероидов в лечении, что позволило сократить потребность в фармакотерапии у 45,5% пациентов. После выявления аллергосенсибилизации показана аллергенспецифическая иммунотерапия 56 детям, в настоящее время из детей, включенных в группу АСИТ, терапию сублингвальными аллергенами получают 42 ребенка.

Выводы

1. Выявление и санация хронических очагов инфекции, бактериальной, грибковой является необходимой составляющей персонифицированной терапии аллергопатологии у детей.

2. При рецидивирующем высевании патогенной флоры (йодофильной флоры, грибов, кокковой флоры) в копрограмме, должно исключать не только транзиторную лактазную недостаточность, но и врожденную лактазную недостаточность, что позволит предупредить развитие в дальнейшем энтероколита, обострение не только кожного статуса, но и респираторных проявлений.

3. При тяжелом течении респираторных вирусных инфекций у детей в период адаптации к детским дошкольным учреждениям в течение адаптационного периода необходимо исключить сенсибилизацию к аллергенам клещей, домашней пыли и эпидермальным аллергенам домашних животных.

4. Комплексный и персонифицированный подход к диагностике аллергопатологии и коморбидных состояний позволяет сформировать условия для стойкой ремиссии, делая возможным проведение аллергенспецифической иммунотерапии, что в перспективе оказывает на болезнь модифицирующее влияние на гиперреактивность наших пациентов.

Список литературы / References

1. Аллергический ринит: клинические рекомендации / Емельянов А.В., Лопатин А.С., Карпищенко С.А., Косяков С.Я., Корбачева О.М., Пискунов Г.З., Шиленкова В.В.; под ред. А.С. Лопатина и В.В. Шиленковой. СПб.: Скифия-принт; М.: Профмедпресс, 2022. 66 с. [Allergic rhinitis: clinical guidelines / Emelyanov A.V., Lopatin A.S., Karpishchenko S.A., Kosyakov S.Ya., Korbacheva O.M., Piskunov G.Z., Shilenkova V.V.; ed. A.S. Lopatin and V.V. Shilenkova]. St. Petersburg: Scyfia-print; M.: Profmedpress, 2022. 66 p.
2. Батуро А.П., Романенко Э.Е., Леонова А.Ю., Ярцева А.С., Савлевич Е.Л., Мокроносова М.А. Доминирование *Staphylococcus aureus* в микробиоценозе полости носа у детей и взрослых с инфекционным и аллергическим ринитом // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии, 2015. № 1. С. 72-74 [Baturo A.P., Romanenko E.E., Leonova A.Yu., Iartseva A.S., Savlevich E.L., Mokronosova M.A. [Domination of *Staphylococcus aureus* in microbiocenosis of nasal cavity in children and adults with infectious and allergic rhinitis]. *Zhurnal mikrobiologii epidemiologii i immunologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2015, Vol. 1, pp. 72-74. (In Russ.)]
3. РАДАР. Аллергический ринит у детей: рекомендации и алгоритм при детском аллергическом рините. 2-е изд., перераб. и доп. М.: Оригинал-макет, 2017. 80 с. [RADAR. Allergic rhinitis in children: recommendations and algorithm for children's allergic rhinitis. 2nd ed., revised. and additional]. Moscow: Original maket, 2017. 80 p.
4. Bousquet J., Schünemann H.J., Togias A., Bachert C., Erhola M., Hellings P.W., Klimek L., Pfaar O., Wallace D., Ansotegui I., Agache I., Bedbrook A., Bergmann K.C., Bewick M., Bonniaud P., Bosnic-Anticevich S., Bossé I., Bouchard J., Boulet L.P., Brozek J., Brusselle G., Calderon M.A., Canonica W.G., Caraballo L., Cardona V., Casale T., Cecchi L., Chu D.K., Costa E.M., Cruz A.A., Czarlewski W., D'Amato G., Devillier P., Dykewicz M., Ebisawa M., Fauquert J.L., Fokkens W.J., Fonseca J.A., Fontaine J.F., Gemiciglu B., van Wijk R.G., Haahela T., Halken S., Jerodiakonou D., Iinuma T., Ivancevich J.C., Jutel M., Kaidashev I., Khaitov M., Kalayci O., Kleine Tebbe J., Kowalski M.L., Kuna P., Kvedariene V., La Grutta S., Larenas-Linnemann D., Lau S., Laune D., Le L., Lieberman P., Lodrup Carlsen K.C., Lourenço O., Marien G., Carreiro-Martins P., Melén E., Menditto E., Neffen H., Mercier G., Mosques R., Mullol J., Muraro A., Namazova L., Novellino E., O'Hehir R., Okamoto Y., Ohta K., Park H.S., Panzner P., Passalacqua G., Pham-Thi N., Price D., Roberts G., Roche N., Rolland C., Rosario N., Ryan D., Samolinski B., Sanchez-Borges M., Scadding G.K., Shamji M.H., Sheikh A., Bom A.T., Toppila-Salmi S., Tsiligianni I., Valentin-Rostan M., Valiulis A., Valovirta E., Ventura M.T., Walker S., Wasserman S., Yorgancioglu A., Zuberbier T.; Allergic Rhinitis and Its Impact on Asthma Working Group. Next-generation Allergic Rhinitis and Its Impact on Asthma

(ARIA) guidelines for allergic rhinitis based on Grading of Recommendations Assessment, Development and Evaluation (GRADE) and real-world evidence. *J. Allergy Clin. Immunol.*, Vol. 145, no. 1, pp. 70-80.e3.

5. Caruso C., Giancaspro R., Guida G., Macchi A., Landi M., Heffler E., Gelardi M. Nasal cytology: a easy diagnostic tool in precision medicine for inflammation in epithelial barrier damage in the nose. A perspective mini review. *Front. Allergy*, 2022, Vol. 3, 768408. doi:10.3389/falgy.2022.768408.

Авторы:

Мархайчук А.З. — врач — аллерголог-иммунолог консультативно-диагностического центра для детей ГБУЗ «Детская областная больница Калининградской области» Министерства здравоохранения Калининградской области, г. Калининград, Россия

Плешкова А.О. — студентка 6-го курса высшей школы медицины НОК «МЕДБИО» ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта», г. Калининград, Россия

Мун А.Ч. — студент 4-го курса высшей школы медицины НОК «МЕДБИО» ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта», г. Калининград, Россия

Гончаров А.Г. — к.м.н., старший научный сотрудник Центра иммунологии и клеточных биотехнологий ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта», г. Калининград, Россия

Authors:

Markhaychuk A.Z., Allergist-Immunologist, Consultative and Diagnostic Center for Children, Children's Regional Hospital of the Kaliningrad Region, Kaliningrad, Russian Federation

Pleshkova A.O., Student, Higher School of Medicine, NOC "MEDBIO", Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation

Mun A.Ch., Student, Higher School of Medicine, NOC "MEDBIO", Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation

Goncharov A.G., PhD (Medicine), Senior Research Associate, Center for Immunology and Cellular Biotechnologies, Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation

Поступила 10.07.2023
Принята к печати 12.07.2023

Received 10.07.2023
Accepted 12.07.2023

МАРКЕРЫ ЭОЗИНОФИЛЬНОГО ВОСПАЛЕНИЯ ДЫХАТЕЛЬНЫХ ПУТЕЙ У ПАЦИЕНТОВ С МИКОГЕННОЙ СЕНСИБИЛИЗАЦИЕЙ

Васильев Н.Ю., Козлова Я.И., Фролова Е.В., Учеваткина А.Е.,
Филиппова Л.В., Аак О.В., Соболев А.В., Васильева Н.В.

ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова»
Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Иммунологические характеристики воспаления дыхательных путей у больных БА с сенсibilизацией к различным грибковым аллергенам изучены недостаточно, поиск новых маркеров необходим для установления будущих мишеней таргетной терапии.

Цель – оценить уровень маркеров эозинофильного воспаления дыхательных путей у больных тяжелой бронхиальной астмой и аллергическим бронхолегочным аспергиллезом в зависимости от спектра микогенной сенсibilизации.

В исследование включили 31 больного тяжелой бронхиальной астмой (БА) с микогенной сенсibilизацией и 29 больных аллергическим бронхолегочным аспергиллезом (АБЛА). В сыворотке крови методом иммуноферментного анализа определяли уровни общего, специфических IgE к грибковым аллергенам и периостина. Изучение активации базофилов проводили методом проточной цитометрии.

У больных тяжелой БА с сенсibilизацией к *Aspergillus* spp. и *Alternaria* spp. по сравнению с группой больных БА с сенсibilизацией только к *Aspergillus* spp. установили значимо более высокие уровни эозинофилов, периостина, показателя ИС к *Alternaria* spp. в тесте активации базофилов. У больных АБЛА с сочетанной сенсibilизацией также зарегистрировали значимо более высокие уровни эозинофилов, периостина, показателя ИС к *Alternaria* spp.

Установленный выраженный эозинофильный тип воспаления у больных бронхиальной астмой с сочетанной сенсibilизацией к термотолерантным и термолабильным грибам может быть следствием агрессивного воздействия грибковых аллергенов на барьерные функции эпителия бронхиального дерева, что необходимо учитывать при выборе терапевтической тактики и назначении иммунологической терапии.

Ключевые слова: бронхиальная астма, микогенная сенсibilизация, *Aspergillus* spp., *Alternaria* spp., периостин, эозинофилы

Адрес для переписки:

Васильев Николай Юрьевич
ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный
медицинский университет имени И.И. Мечникова»
194291, Россия, Санкт-Петербург,
ул. Сантьяго-де-Куба, 1, кв. 28.
Тел.: 8 (812) 303-51-40.
Факс: 8 (812) 510-62-77.
E-mail: wwjd2000@mail.ru

Address for correspondence:

Nikolay Yu. Vasiliev
North-Western State I. Mechnikov Medical University
1 Santjago-de Cuba St, Apt 28
St. Petersburg
194291 Russian Federation
Phone: +7 (812) 303-51-40.
Fax: +7 (812) 510-62-77.
E-mail: wwjd2000@mail.ru

Образец цитирования:

Н.Ю. Васильев, Я.И. Козлова, Е.В. Фролова,
А.Е. Учеваткина, Л.В. Филиппова, О.В. Аак,
А.В. Соболев, Н.В. Васильева «Маркеры эозинофильного
воспаления дыхательных путей у пациентов
с микогенной сенсibilизацией» // Российский
иммунологический журнал, 2023. Т. 26, № 4. С. 547-552.
doi: 10.46235/1028-7221-13616-MOE

© Васильев Н.Ю. и соавт., 2023
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

N. Yu. Vasiliev, Ya. I. Kozlova, E. V. Frolova, A. E. Uchevatkina,
L. V. Filippova, O. V. Aak, A. V. Sobolev, N. V. Vasilieva
“Markers of eosinophilic inflammation of airways in patients
with fungal sensitization”, Russian Journal of Immunology/
Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2023, Vol. 26, no. 4,
pp. 547-552.
doi: 10.46235/1028-7221-13616-MOE

© Vasiliev N. Yu. et al., 2023
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.46235/1028-7221-13616-MOE

MARKERS OF EOSINOPHILIC INFLAMMATION OF AIRWAYS IN PATIENTS WITH FUNGAL SENSITIZATION

Vasiliev N. Yu., Kozlova Ya. I., Frolova E. V., Uchevatkina A. E.,
Filippova L. V., Aak O. V., Sobolev A. V., Vasilyeva N. V.

North-Western State I. Mechnikov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. Immunological characteristics of airway inflammation in asthma patients with sensitization to various fungal allergens are not well understood, and the search for new markers is necessary to establish future targets for targeted therapy. The purpose of our study was to assess the levels of eosinophilic inflammation markers of the respiratory tract in patients with severe asthma and allergic bronchopulmonary aspergillosis, depending on the spectrum of fungal sensitization.

The study included 31 patients with severe asthma with fungal sensitization and 29 patients with allergic bronchopulmonary aspergillosis (ABPA). The levels of total, specific IgE to fungal allergens and periostin in blood serum were determined by enzyme immunoassay. The study of basophil activation was performed by flow cytometry.

The patients with severe asthma and sensitization to *Aspergillus* spp. and *Alternaria* spp. had significantly higher levels of eosinophils, periostin, and stimulation index to *Alternaria* spp. in the basophil activation test when compared with the group of asthma patients with sensitization to *Aspergillus* spp. only. In patients with ABPA with combined sensitization, we have found significantly higher levels of eosinophils, periostin, and stimulation index to *Alternaria* spp.

The finding of pronounced eosinophilic type of inflammation in patients with asthma and combined sensitization to thermotolerant and thermolabile fungi may result from aggressive effect of fungal allergens on the barrier functions of bronchial epithelium, which should be taken into account when choosing therapeutic strategy and administration of immunobiological therapy.

Keywords: asthma, fungal sensitization, *Aspergillus* spp., *Alternaria* spp., periostin, eosinophils

Введение

На современном этапе отмечено увеличение доли пациентов с тяжелым течением бронхиальной астмы (БА), для которых характерны высокая частота жизнеугрожающих обострений, значительное снижение функции легких и резистентность к стандартной терапии [4, 6]. Несмотря на достигнутый прогресс в лечении БА, изучение факторов способных влиять на контроль и развитие тяжелого течения заболевания, остается одной из самых обсуждаемых проблем современной медицины [9]. В последние годы растет внимание к этиопатогенетической роли различных микроскопических грибов, особое место среди которых, занимают *Aspergillus* spp. и *Alternaria* spp. [1].

Термотолерантные нитевидные грибы *Aspergillus* spp. способны размножаться при температуре человеческого тела. Благодаря этому *Aspergillus* spp. не только сенсибилизируют пациентов с атопией, но и колонизируют дыхательные пути, что может приводить к развитию аллергического бронхолегочного аспергиллеза (АБЛА) [1]. Термолабильные грибы *Alternaria* spp. выступают только в роли аэроаллергенов. Иммунологические характеристики воспаления дыхательных

путей у больных БА с сенсибилизацией к различным грибковым аллергенам изучены недостаточно, поиск новых маркеров необходим для установления будущих мишеней таргетной терапии [8].

Цель — оценить уровень маркеров эозинофильного воспаления дыхательных путей у больных тяжелой бронхиальной астмой и аллергическим бронхолегочным аспергиллезом в зависимости от спектра микогенной сенсибилизации.

Материалы и методы

В исследование включили 31 больного тяжелой БА с микогенной сенсибилизацией (средний возраст — $50,8 \pm 2,6$ года, 77,4% женщин) и 29 больных АБЛА (средний возраст — $45,9 \pm 3,0$ года, 64,0% женщин), которые проходили стационарное или амбулаторное лечение в ФГБОУ ВО СЗГМУ им. И.И. Мечникова Минздрава России.

Уровни общего и специфических IgE к аэроаллергенам («Алкор Био», Россия), содержание периостина (R&D Systems, США) определяли в сыворотке крови методом иммуноферментного анализа. Изучение активации базофилов проводили методом проточной цитометрии с исполь-

зованием набора Allergenicity kit (Cellular Analysis of Allergy, Beckman Coulter). Идентификацию базофилов осуществляли с помощью маркеров CD3-CRTH2⁺ (CRTH2-хемоаттрактантный рецептор, который присутствует как на Th2, так и на базофилах), а выявление активации базофилов – по увеличению содержания клеток с высокой экспрессией CD203c. Индекс стимуляции (ИС) рассчитывали как отношение процента активированных базофилов в пробе с аллергеном к проценту их спонтанной активации в отрицательном контроле.

Микогенную сенсibilизацию и аллергический бронхолегочный аспергиллез (АБЛА) устанавливали согласно рекомендациям рабочей группы ISHAM (International Society for Human and Animal Mycology, 2013). Критериями микогенной сенсibilизации было выявление в сыворотке крови уровня специфического IgE к *Aspergillus* spp. или *Alternaria* spp., соответствующего классу 1 и выше ($\geq 0,35$ МЕ/мл) [2].

Полученные в процессе исследования данные обрабатывали с помощью программной системы STATISTICA 10 (StatSoft, США).

Результаты и обсуждение

Больные тяжелой БА были разделены на группы: первую группу составили 15 больных с сочетанной сенсibilизацией к *Aspergillus* spp. и *Alternaria* spp., во вторую группу включили 16 больных с сенсibilизацией только к *Aspergillus* spp. (табл. 1). По возрасту и полу группы были сопоставимы. У больных БА в группе 1 по сравнению с группой 2 установили значимо более высокие уровни эозинофилов ($0,47$ ($0,39-0,72$) $10^9/л$ vs $0,23$ ($0,17-0,41$) $10^9/л$, $p = 0,003$) и периостина ($37,7$ ($25,5-51,9$) нг/мл vs $20,0$ ($11,0-27,5$) нг/мл, $p = 0,016$). Анализ показателей теста активации базофилов выявил значимое увеличение ИС *Alternaria* spp. в группе с сочетанной сенсibilизацией ($1,72$ ($1,60-1,86$) vs $1,10$ ($0,88-1,62$), $p = 0,031$). Уровень общего IgE и показатель ИС *Aspergillus* spp. в группах значимо не различались ($p = 0,385$ и $p = 0,62$ соответственно).

ТАБЛИЦА 1. СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МАРКЕРОВ ВОСПАЛЕНИЯ У ПАЦИЕНТОВ С ТЯЖЕЛОЙ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ НАЛИЧИЯ СЕНСIBILИЗАЦИИ К ASPERGILLUS SPP. И ALTERNARIA SPP., n = 31

TABLE 1. COMPARATIVE CHARACTERISTICS OF INFLAMMATION MARKERS IN PATIENTS WITH SEVERE ASTHMA, DEPENDING ON THE PRESENCE OF SENSITIZATION TO ASPERGILLUS SPP. AND ALTERNARIA SPP., n = 31

Показатель Parameter	Группа 1 <i>Aspergillus</i> spp. (+) <i>Alternaria</i> spp. (+) Group 1 <i>Alternaria</i> spp. (+) <i>Aspergillus</i> spp. (+) (n = 15)	Группа 2 <i>Aspergillus</i> spp. (+) Group 2 <i>Aspergillus</i> spp. (+) (n = 16)	p*
slgE к <i>Aspergillus</i> spp., МЕ/мл slgE to <i>Aspergillus</i> spp., IU/mL	0,98 (0,75-1,25)	0,89 (0,60-1,52)	0,721
slgE к <i>Alternaria</i> spp., МЕ/мл slgE to <i>Alternaria</i> spp., IU/mL	0,37 (0,36-0,65)	0,03 (0,01-0,08)	0,000
IgE общий, МЕ/мл IgE total, IU/mL	369,0 (61,0-866,0)	192,0 (52,0-788,0)	0,385
Эозинофилы, $\times 10^9/л$ Eosinophils, $\times 10^9/L$	0,47 (0,39-0,72)	0,23 (0,17-0,41)	0,003
Периостин, нг/мл Periostin, ng/mL	37,7 (25,5-51,9)	20,0 (11,0-27,5)	0,016
ИС <i>Aspergillus</i> spp. IS <i>Aspergillus</i> spp.	2,06 (1,29-4,40)	2,37 (1,58-10,45)	0,620
ИС <i>Alternaria</i> spp. IS <i>Alternaria</i> spp.	1,72 (1,60-1,86)	1,10 (0,88-1,62)	0,031

Примечание. * – значимость критерия Манна–Уитни при попарных сравнениях.

Note. *, significance of the Mann–Whitney test in pairwise comparisons.

ТАБЛИЦА 2. СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МАРКЕРОВ ВОСПАЛЕНИЯ У ПАЦИЕНТОВ С АБЛА В ЗАВИСИМОСТИ ОТ НАЛИЧИЯ СЕНСИБИЛИЗАЦИИ К *ASPERGILLUS* SPP. И *ALTERNARIA* SPP., n = 29

TABLE 2. COMPARATIVE CHARACTERISTICS OF INFLAMMATION MARKERS IN ABPA PATIENTS DEPENDING ON THE PRESENCE OF SENSITIZATION TO *ASPERGILLUS* SPP. AND *ALTERNARIA* SPP., n = 29

Показатель Parameter	Группа 1 <i>Aspergillus</i> spp. (+) <i>Alternaria</i> spp. (+) Group 1 <i>Alternaria</i> spp. (+) <i>Aspergillus</i> spp. (+) (n = 15)	Группа 2 <i>Aspergillus</i> spp. (+) Group 2 <i>Aspergillus</i> spp. (+) (n = 14)	p*
slgE к <i>Aspergillus</i> spp., МЕ/мл slgE to <i>Aspergillus</i> spp., IU/mL	13,68 (3,58-20,90)	1,63 (0,69-7,61)	0,013
slgE к <i>Alternaria</i> spp., МЕ/мл slgE to <i>Alternaria</i> spp., IU/mL	0,40 (0,38-4,75)	0,01 (0,01-0,04)	0,000
IgE общий, МЕ/мл IgE total, IU/mL	2090,0 (1150,0-3000,0)	1123,5 (518,0-1870,0)	0,064
Эозинофилы, × 10 ⁹ /л Eosinophils, × 10 ⁹ /L	0,73 (0,51-1,39)	0,35 (0,32-0,47)	0,002
Периостин, нг/мл Periostin, ng/mL	39,1 (33,3-64,6)	30,1 (23,2-32,4)	0,003
ИС <i>Aspergillus</i> spp. IS <i>Aspergillus</i> spp.	19,80 (17,14-54,22)	21,11 (14,95-29,14)	0,433
ИС <i>Alternaria</i> spp. IS <i>Alternaria</i> spp.	16,50 (4,81-17,70)	1,03 (0,90-1,75)	0,011

Примечание. * – значимость критерия Манна–Уитни при попарных сравнениях.

Note. *, significance of the Mann–Whitney test in pairwise comparisons.

Больные АБЛА также были разделены на группы в зависимости от спектра микогенной сенсibilизации: первую группу составили 15 больных с сенсibilизацией к *Aspergillus* spp. и *Alternaria* spp., во вторую группу включили 14 больных с сенсibilизацией только к *Aspergillus* spp. (табл. 2). По демографическим показателям группы не различались. У больных АБЛА в группе 1 по сравнению с группой 2 зарегистрировали значимо более высокие уровни эозинофилов (0,73 (0,51-1,39) 10⁹/л vs 0,35 (0,32-0,47) 10⁹/л, p = 0,002) и периостина (39,1 (33,3-64,6) нг/мл vs 30,1 (23,2-32,4) нг/мл, p = 0,003). В группе АБЛА с сочетанной сенсibilизацией ИС *Alternaria* spp. был значимо выше, медианный показатель составил (16,50 (4,81-17,70) vs 1,03 (0,90-1,75), p = 0,011). Уровень общего IgE, а также ИС *Aspergillus* spp. в группах значимо не различались (p = 0,064 и p = 0,433 соответственно).

Признанными и наиболее доступными в рутинной практике маркерами воспаления дыхательных путей при БА являются эозинофилы периферической крови [5]. Эозинофилы могут вносить свой вклад в патофизиологию грибок-

вой астмы, увеличивая гиперреактивность дыхательных путей, активируя Th2-клетки и вызывая ремоделирование дыхательных путей [9]. В группах БА и АБЛА с сочетанной сенсibilизацией к термотолерантным и термолабильным микромицетам продемонстрирована гиперпродукция IgE, рекрутирование эозинофилов и выработка аномального воспалительного ответа в дыхательных путях, вызванная стимуляцией *Aspergillus* spp. и *Alternaria* spp. Известно, что у данной категории пациентов это может сопровождаться избыточной продукцией муцина, инфильтрацией муцина бронхов эозинофилами и приводить к более тяжелому течению заболевания. Таким образом, полученные нами данные соответствуют сформированным ранее представлениям о доминировании эозинофильного воспаления, развивающегося в дыхательных путях больных БА с микогенной сенсibilизацией [10]. Значимые повышения показателя ИС в исследуемых группах свидетельствуют о возможности использования теста активации базофилов в диагностике микогенной аллергии.

В настоящее время периостин рассматривают не только как универсальный маркер эозинофильного воспаления и уровня контроля БА, но и предиктор нестабильного течения заболевания [3]. Динамические изменения уровня периостина позволяют оценить эффективность объема стероидной терапии, а также периостин применяют как предиктор эффективности моноклональных антител к IL-13 [7]. Китайские ученые выявили взаимосвязь уровней периостина, общего IgE и sIgE к *Aspergillus fumigatus* с уровнями IL-5 и количеством эозинофилов периферической крови [11]. Полученные в ходе нашей работы данные также свидетельствуют о перспектив-

ности дальнейшего исследования периостина в качестве дополнительного маркера у больных с микогенной сенсibilизацией.

Заключение

Установленный выраженный эозинофильный тип воспаления у больных БА с сочетанной сенсibilизацией к термотолерантным и термолабильным грибам может быть следствием агрессивного воздействия грибковых аллергенов на барьерные функции эпителия бронхиального дерева, что необходимо учитывать при выборе терапевтической тактики и назначении иммунобиологической терапии.

Список литературы / References

1. Agarwal R. Severe asthma with fungal sensitization. *Curr. Allergy Asthma Rep.*, 2011, Vol. 11, no. 5, pp. 403-413.
2. Agarwal R., Chakrabarti A., Shah A., Gupta D., Meis J.F., Guleria R., Moss R., Denning D.W. Allergic bronchopulmonary aspergillosis: review of literature and proposal of new diagnostic and classification criteria. *Clin. Exp. Allergy*, 2013, Vol. 43, no. 8, pp. 850-873.
3. Corren J., Pham T.H., Garcia Gil E., Sařapa K., Ren P., Parnes J.R., Colice G., Griffiths J.M. Baseline type 2 biomarker levels and response to tezepelumab in severe asthma. *Allergy*, 2022, Vol. 77, no. 6, pp. 1786-1796.
4. Goh K.J., Yui A.C.A., Lapperre T.S., Chan A.K., Chew F.T., Chotirmall S.H., Koh M.S. Sensitization to *Aspergillus* species is associated with frequent exacerbations in severe asthma. *J. Asthma Allergy*, 2017, Vol. 10, pp. 131-140.
5. Johansson M.W. Activation states of blood eosinophils in asthma. *Clin. Exp. Allergy*, 2014, Vol. 44, no. 4, pp. 482-498.
6. Kao C.C., Hanania N.A., Parulekar A.D. The impact of fungal allergic sensitization on asthma. *Curr. Opin. Pulm. Med.*, 2021, Vol. 27, no. 1, pp. 3-8.
7. Liu Y., Zhang S., Chen R., Wei J., Guan G., Zhou M., Dong N., Cao Y. Meta-analysis of randomized controlled trials for the efficacy and safety of anti-interleukin-13 therapy with lebrikizumab in patients with uncontrolled asthma. *Allergy Asthma Proc.*, 2018, Vol. 39, no. 5, pp. 332-337.
8. Rapeport W.G., Ito K., Denning D.W. The role of antifungals in the management of patients with severe asthma. *Clin. Transl. Allergy*, 2020, Vol. 10, 46. doi: 10.1186/s13601-020-00353-8.
9. Tiwary M., Samarasinghe A.E. Initiation and pathogenesis of severe asthma with fungal sensitization. *Cells*, 2021, Vol. 10, no. 4, 913. doi: 10.3390/cells10040913.
10. Wardlaw A.J., Rick E.-M., Ozyigit L., Pur., Scadding A., Gaillard E.A., Pashley C.H. New perspectives in the diagnosis and management of allergic fungal airway disease. *J. Asthma Allergy*, 2021, Vol. 14, pp. 557-573.
11. Wu G., Meng X., Zheng P., Zhang X.D., Li L., Hu H., Sun B. Elevated serum levels of periostin in patients with allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Mycoses*, 2019, Vol. 62, no. 9, pp. 780-789.

Авторы:

Васильев Н.Ю. — аспирант кафедры клинической микологии, аллергологии и иммунологии ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Козлова Я.И. — к.м.н., доцент кафедры клинической микологии, аллергологии и иммунологии ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Фролова Е.В. — к.м.н., заведующая НИЛ иммунологии и аллергологии ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Authors:

Vasiliev N. Yu., Postgraduate Student, Department of Clinical Mycology, Allergology and Immunology, North-Western State I. Mechnikov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Kozlova Ya. I., PhD (Medicine), Associate Professor, Research Laboratory of Immunology and Allergology, North-Western State I. Mechnikov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Frolova E. V., PhD (Medicine), Head, Research Laboratory of Immunology and Allergology, North-Western State I. Mechnikov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Учеваткина А.Е. — к.м.н., старший научный сотрудник
НИЛ иммунологии и аллергологии ФГБОУ ВО
«Северо-Западный государственный медицинский
университет имени И.И. Мечникова» Министерства
здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Филиппова Л.В. — к.м.н., старший научный сотрудник
НИЛ иммунологии и аллергологии ФГБОУ ВО
«Северо-Западный государственный медицинский
университет имени И.И. Мечникова» Министерства
здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Аак О.В. — к.х.н., ведущий научный сотрудник
НИЛ иммунологии и аллергологии ФГБОУ ВО
«Северо-Западный государственный медицинский
университет имени И.И. Мечникова» Министерства
здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Соболев А.В. — д.м.н., профессор кафедры клинической
микологии, аллергологии и иммунологии ФГБОУ ВО
«Северо-Западный государственный медицинский
университет имени И.И. Мечникова» Министерства
здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Васильева Н.В. — д.б.н., профессор, директор
НИИ медицинской микологии имени П.Н. Кашкина
ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный
медицинский университет имени И.И. Мечникова»
Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург,
Россия

Uchevatkina A.E., PhD (Medicine), Senior Research
Associate, Research Laboratory of Immunology and
Allergology, North-Western State I. Mechnikov Medical
University, St. Petersburg, Russian Federation

Filippova L.V., PhD (Medicine), Senior Research Associate,
Research Laboratory of Immunology and Allergology, North-
Western State I. Mechnikov Medical University, St. Petersburg,
Russian Federation

Aak O.V., PhD (Chemistry), Leading Research Associate,
Research Laboratory of Immunology and Allergology, North-
Western State I. Mechnikov Medical University, St. Petersburg,
Russian Federation

Sobolev A.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Department
of Clinical Mycology, Allergology and Immunology, North-
Western State I. Mechnikov Medical University, St. Petersburg,
Russian Federation

Vasilieva N.V., PhD, MD (Biology), Professor, Director,
P. Kashkin Research Institute of Medical Mycology, North-
Western State I. Mechnikov Medical University, St. Petersburg,
Russian Federation

Поступила 08.07.2023
Принята к печати 12.07.2023

Received 08.07.2023
Accepted 12.07.2023

ПОКАЗАТЕЛИ КЛЕТОЧНОГО И ГУМОРАЛЬНОГО ИММУНИТЕТА У ПАЦИЕНТКИ С ЦЕНТРАЛЬНОЙ ФОРМОЙ ПРЕЖДЕВРЕМЕННОГО ПОЛОВОГО РАЗВИТИЯ В АНАМНЕЗЕ

Хисамутдинова Д.Р., Козлова Я.И., Башнина Е.Б., Фролова Е.В.,
Учеваткина А.Е., Филиппова Л.В., Васильева Н.В.

ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова»
Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Этиология преждевременного полового развития включает органические поражения, генетические мутации, но в подавляющем большинстве случаев причина остается неясна. Для лечения гонадотропин-зависимой формы преждевременного полового развития применяют агонисты гонадотропин-рилизинг гормона. Блокируя секрецию гонадотропин-рилизинг гормона, препараты позволяют остановить развитие половых признаков, препятствует преждевременному закрытию зон окостенения, тем самым увеличивая конечный рост ребенка. В последние годы возрос интерес к эффекту данной группы препаратов вне гипоталамо-гипофизарной-гонадной оси. Опубликованы серии клинических случаев развития аутоиммунных заболеваний таких, как аутоиммунный тиреоидит, диффузный токсический зоб, сахарный диабет 1-го типа. В статье представлено клиническое наблюдение пациентки с центральной формой преждевременного развития, с удовлетворительным ответом на лечение препаратом из группы агонистов гонадотропин-рилизинг гормона. Дальнейшее наблюдение не показало нарушений репродуктивной функции. В результате иммунологического обследования выявлено нарушение только в клеточном звене иммунитета. Установили повышенную метаболическую активность нейтрофилов, что может свидетельствовать о неспецифическом воспалительном процессе. Уровни иммуноглобулинов А, М, G соответствовали нормативным значениям. Таким образом, терапия препаратом из группы агонистов гонадотропин-рилизинг гормона была эффективна и безопасна с точки зрения влияния на иммунную систему пациентки. Роль гормональных нарушений и влияние агонистов гонадотропин-рилизинг гормона на развитие иммунопатологических состояний требуют дальнейшего изучения.

Ключевые слова: гонадотропин-зависимое преждевременное половое развитие, агонист гонадотропин-рилизинг гормона, клеточный иммунный ответ, гуморальный иммунный ответ

Адрес для переписки:

Хисамутдинова Диляра Риваловна
ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный
медицинский университет имени И.И. Мечникова»
Министерства здравоохранения РФ
194291, Россия, Санкт-Петербург,
ул. Сантьяго-де-Куба, 1, кв. 28.
Тел.: 8 (812) 303-51-40.
Факс: 8 (812) 510-62-77.
E-mail: dilyara001@gmail.com

Address for correspondence:

Diliara R. Khisamutdinova
I. Mechnikov North-Western State Medical University
1 Santiago de Cuba St, Apt 28
St. Petersburg
194291 Russian Federation
Phone: +7 (812) 303-51-40.
Fax: +7 (812) 510-62-77.
E-mail: dilyara001@gmail.com

Образец цитирования:

Д.Р. Хисамутдинова, Я.И. Козлова, Е.Б. Башнина,
Е.В. Фролова, А.Е. Учеваткина, Л.В. Филиппова,
Н.В. Васильева «Показатели клеточного и
гуморального иммунитета у пациентки с центральной
формой преждевременного полового развития
в анамнезе» // Российский иммунологический журнал,
2023. Т. 26, № 4. С. 553-558.
doi: 10.46235/1028-7221-13906-IOC

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

For citation:

D.R. Khisamutdinova, Ya.I. Kozlova, E.B. Bashnina,
E.V. Frolova, A.E. Uchevatkina, L.V. Filippova,
N.V. Vasilyeva "Indices of cellular and humoral immunity
in a patient with a history of central precocious puberty in
anamnesis", Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy
Immunologicheskii Zhurnal, 2023, Vol. 26, no. 4, pp. 553-558.
doi: 10.46235/1028-7221-13906-IOC

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

DOI: 10.46235/1028-7221-13906-IOC

INDICES OF CELLULAR AND HUMORAL IMMUNITY IN A PATIENT WITH A HISTORY OF CENTRAL PRECOCIOUS PUBERTY IN ANAMNESIS

**Khisamutdinova D.R., Kozlova Ya.I., Bashnina E.B., Frolova E.V.,
Uchevatkina A.E., Filippova L.V., Vasilyeva N.V.**

I. Mechnikov North-Western State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. The etiology of precocious puberty includes organic anomalies, genetic mutations, but the primary cause remains unclear in the vast majority of cases. Gonadotropin-releasing hormone (GRH) agonists are used as a treatment of gonadotropin-dependent precocious puberty. Blocking the secretion of gonadotropin-releasing hormone, these drugs stop the premature development of sexual features, prevent premature closure of ossification zones, thereby increasing the child's expected adult height. The interest in the effects of this group of drugs beyond the hypothalamic-pituitary-gonadal axis has been recently increased. A series of clinical cases have been reported on the development of autoimmune diseases, e.g., autoimmune thyroiditis, Graves disease and type 1 diabetes. The article presents a clinical observation of a patient with central form of premature development who exhibited satisfactory response to treatment with a GRH agonist drug. Further follow-up did not show any reproductive dysfunction. Upon immunological examination, a disturbance was revealed only in the cellular component of immunity. An increased metabolic activity of neutrophils was found, thus, probably, indicating a nonspecific inflammatory process. The levels of immunoglobulins A, M, G matched the reference values. Thus, the therapy with a drug from the group of GRH agonists was effective and safe in terms of influencing the patient's immune system. The role of hormonal disorders and effects of GRH agonists on the development of immunopathological conditions require further research.

Keywords: gonadotropin-dependent precocious puberty, gonadotropin-releasing hormone agonist, cellular immune response, humoral immune response

Введение

Гормональная активация гипоталамо-гипофизарно-гонадной системы определяет клинические проявления полового развития ребенка. При этом инициация пубертата у девочек до 8-летнего возраста приводит к преждевременному половому развитию (ППР) и последующим нарушениям репродуктивного здоровья с формированием низкорослости и социальной депривации.

Согласно современной классификации, выделяют центральную (гонадотропин-зависимую), периферическую (гонадотропин-независимую) формы и парциальную формы ППР [1]. Гонадотропин-зависимая форма преждевременного полового развития обусловлена преждевременной активацией центрального звена гипоталамо-гипофизарной оси, что в результате приводит к повышенной секреции половых гормонов гонадами. Причиной тому могут являться опухоли, органические поражения ЦНС, генетические anomalies. Однако в преобладающем большинстве случаев причина центральной формы ППР остается неясна, такую форму заболевания назы-

вают идиопатической. Современные методы лечения при центральной форме ППР основаны на подавлении продукции гонадотропинов агонистами гонадотропин-рилизинг гормона (аГНРГ). Препараты трипторелина (аГНРГ) используют в мировой и отечественной клинической практике при ППР в течение последних 20 лет.

Длительная, более 3 лет, терапия аГНРГ признана безопасной и эффективной, в литературе нет убедительных данных о значимых побочных действиях препарата. Однако в долгосрочной перспективе его безопасность и влияние на иммунную систему детей и подростков остается малоизученной. Вместе с тем, в литературе появились данные об увеличении частоты развития аутоиммунных заболеваний, таких как сахарный диабет 1-го типа и аутоиммунный тиреоидит у детей, получавших лечение аГНРГ по поводу ППР [5].

Цель – провести анализ показателей иммунного статуса пациента с преждевременным половым развитием центральной генеза, получавшего лечение аГНРГ в течение трех лет.

Материалы и методы

Пациентке в возрасте 7 лет был поставлен диагноз «преждевременное половое развитие центрального генеза». Первые клинические проявления пубертата – увеличение грудных желез, отмечались с 6-летнего возраста. При этом появилось лобковое оволосение, значительно ускорился рост.

Из анамнеза известно, что ребенок рожден от 1-й беременности, протекавшей без осложнений. На протяжении беременности мать единожды перенесла ОРВИ. Роды срочные, физиологические. Длина тела при рождении 53 см, масса тела – 3220 грамм, перинатальный анамнез не отягощен. Наследственность по эндокринным заболеваниям отягощена по материнской линии: у бабушки сахарный диабет 2-го типа, у мамы – диффузный токсический зоб в анамнезе.

На момент первого обследования по поводу появления вторичных половых признаков в возрасте 7 лет выявлено значительное превышение относительно возраста параметров физического развития: рост – 140 см (+3,1 SDS), масса 29 кг (+1,56 SDS массы по росту). Индекс массы тела (ИМТ) 14,8 кг/м² (-0,38 SDS). Половая формула по шкале Таннер: А1, Р2, Ма 2-3, Ме(-). Скорость роста составляла 11 см за предшествующий обследованию год. Были обнаружены признаки опережения костного возраста: рентгенограмма лучезапястных суставов выявила соответствие костного возраста 10-10,5 годам. Визуализация органов малого таза (УЗИ) показала их соответствие возрасту 10 лет: размеры матки: 32,5 × 13 × 20 мм, шейка – 9,7 мм. Яичники – правый 19 × 9,4 × 10 мм, с мелкими фолликулами, левый – 15 × 8,3 × 10 мм с мелкими фолликулами. Результаты исследования базальной секреции гормонов не показали значимых отклонений от референсных значений: ФСГ – 6,78 мМЕ/мл, ЛГ – 1,37 мМЕ/мл, ТТГ – 2,21 мкЕд/мл, св.Т4 – 17 пмоль/л, пролактин – 296,4 мМЕ/мл, за исключением эстрадиола – 41,9 пг/мл, концентрация которого свидетельствовала об активности половых желез.

С целью верификации формы ППР была проведена стимуляционная проба с аналогом ГнРГ (трипторелин 0,1 мг внутримышечно), по результатам которой выявлено повышение секреторной активности гонадотропинов: ЛГ – 4,49 мМЕ/мл, ФСГ – 9,38 мМЕ/мл; через 4 часа: ЛГ – 23,5 мМЕ/мл, ФСГ – 27,3 мМЕ/мл. По данным визуализации гипофиза (МРТ головного мозга и гипофиза) была исключена органическая природа гормональных нарушений. Таким образом, была подтверждена гонадотропин-зависи-

мая форма преждевременного полового развития у девочки 7 лет.

Учитывая клинические проявления, лабораторные и визуализирующие методы исследования пациентке в возрасте 7 лет поставлен диагноз «Истинное идиопатическое преждевременное половое развитие» и была начата терапия препаратом группы аналогов гонадотропин-рилизинг гормона пролонгированного действия (трипторелин) в дозировке 3,75 мг 1 раз в 28 дней.

На фоне лечения, направленного на подавление секреции гонадотропинов, было отмечено отсутствие прогрессирования вторичных половых признаков. Показатели гормонального профиля достигли допубертатных значений. По данным УЗИ органов малого таза размеры матки и яичников соответствовали возрастной норме. Замедлилось прогрессирование костного возраста, который соответствовал паспортному через 3 года терапии. Динамика роста свидетельствовала о замедлении его скорости: в первый год терапии 6 см в год, во второй год – 7 см, за третий год – 4 см. На момент отмены терапии возраст девочки составил 10 лет 2 месяца. Физическое развитие соответствовало высокому, гармоничному: рост – 157 см (+2,7 SDS), масса тела – 49 кг (+1,83 SDS массы тела по росту), ИМТ 19,9 кг/м² (+1,24 SDS). Половая формула по шкале Таннер соответствовала А2, Р2, Ма3, Ме (-), что расценивалась, как физиологическая, соответствующая возрасту пациента. В течение трехлетнего периода лечения трипторелином не было зафиксировано нежелательных явлений, связанных с ежемесячным внутримышечным введением препарата. Частота ОРВИ и перенесенных инфекций составляла не более двух раз в год.

Для оценки иммунного статуса пациентке проведено иммунологическое обследование в НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина: лейкоцитарная формула, субпопуляция лимфоцитов (CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD19⁺, CD25⁺, CD56⁺), иммуноглобулины А, М, G, НСТ-тест.

Результаты и обсуждение

Анализ показателей субпопуляционного состава лимфоцитов пациентки выявил значимое повышение абсолютного числа цитотоксических Т-лимфоцитов (CD3⁺CD8⁺) до 1,024 × 10⁹/л (0,37-1,00 × 10⁹/л), относительного числа до 35% (19-35%), снижение ИРИ до 1,3 (1,5-2,0) и снижение относительного числа NK-клеток (CD3⁺CD56⁺) до 6% (8-17%). Установлено снижение способности клеток крови к продукции IFN – 623 пг/мл (1000-5000 пг/мл) в ответ на стимуляцию ФГА. Выявлено усиление метаболической активности нейтрофилов: НСТ спонтанный – 27% (11-18%),

НСТ активированный – 63% (40-60%). Не установлено изменений в гуморальном звене иммунитета – уровни иммуноглобулинов А, М, G соответствовали нормативным значениям.

В настоящее время пациенты с гонадотропин-зависимой формой ППР включаются в «Федеральный регистр лиц, страдающих жизнеугрожающими и хроническими прогрессирующими редкими (орфанными) заболеваниями, приводящими к сокращению продолжительности жизни граждан или их инвалидность».

В регистре Санкт-Петербурга в настоящее время 76 пациентов с истинным преждевременным половым развитием. Лечение проводится пролонгированной формой аГнРГ – трипторелин 11,25 мг. При этом, в течение последнего года расширились показания к назначению препарата, что повлечет увеличение числа больных, которым будет необходимо его применение.

Изучению влияния гонадотропин-рилизинг гормона, гонадотропинов вместе с половыми гормонами на показатели иммунной системы организма посвящен ряд научных исследований. По данным исследования, проведенному Berntorp и соавт. (2013), пациенты с сахарным диабетом 1-го типа имели повышенный уровень экспрессии IgM к гонадотропин-рилизинг гормону [3]. Метаанализ, проведенный Rakab и соавт. (2022) также подтвердил зависимость наличия сахарного диабета и IgM к ГнРГ, подчеркнув необходимость дальнейшего изучения данной взаимосвязи [8]. Более того, в литературе имеются данные о развитии у детей аутоиммунных заболеваний на фоне терапии аГнРГ, таких как аутоиммунный тиреоидит, сахарный диабет 1-го типа [5]. Также исследование Li Wang и соавт. (2009) показало значимый эффект уровня интестинального ГнРГ на глюкозу сыворотки крови что может означать участие ГнРГ в углеводном обмене [9].

Также опубликованы серии клинических случаев развития аутоиммунного тиреоидита или дисфункции щитовидной железы на фоне лечения преждевременного полового развития аГнРГ [4, 7]. Кроме аутоиммунного тиреоидита, описан случай развития болезни Грейвса спустя 4 месяца после начала лечения аГнРГ у двух взрослых женщин [2]. В клиническом случае, описанном Metcalfe и Boulton-Jones, инъекции лейпрорелина по поводу лейомиомы у 37-летней женщины привели к обострению волчаночного нефрита [6].

По современным литературным данным рецепторы к гонадотропин-рилизинг гормону обнаружены во многих органах и тканях организма, включая селезенку, тимус, CD4⁺ и CD8⁺ субпопуляции лимфоцитов [11]. На животных моделях было показано, что активация рецептора ГнРГ Т-регуляторных лимфоцитов ведет к нарушению их способности ингибирования пролиферации Т-клеток [10]. В представленном клиническом случае у пациентки с центральной формой преждевременного полового развития в анамнезе после длительной терапии трипторелином выявлены нарушения только в клеточном звене иммунитета. Усиление метаболической активности нейтрофилов может свидетельствовать о неспецифическом хроническом воспалительном процессе. Таким образом, терапия трипторелином была не только эффективна, но и безопасна с точки зрения влияния на различные звенья иммунной системы.

Заключение

Определение роли гормональных нарушений при преждевременном половом развитии, а также влияния гормональной терапии на развитие иммунопатологических состояний требует дальнейшего изучения и является важным направлением в разработке мер профилактики иммунозависимых заболеваний у данной категории пациентов.

Список литературы / References

1. Петеркова В.А., Алимова И.Л., Башнина Е.Б., Безлепкина О.Б., Болотова Н.В., Зубкова Н.А., Калинин Н.Ю., Карева М.А., Кияев А.В., Колодкина А.А., Кострова И.Б., Маказан Н.В., Малиевский О.А., Орлова Е.М., Петрайкина Е.Е., Самсонова Л.Н., Таранушенко Т.Е. Клинические рекомендации «Преждевременное половое развитие» // Проблемы эндокринологии, 2021. Т. 67, № 5. С. 84-103. [Peterkova V.A., Alimova I.L., Bashnina E.B., Bezlepkina O.B., Bolotova N.V., Zubkova N.A., Kalinchenko N.Yu., Kareva M.A., Kiyayev A.V., Kolodkina A.A., Kostrova I.B., Makazan N.V., Malievsky O.A., Orlova E.M., Petraykina E.E., Samsonova L.N., Taranushenko T.E. Clinical guidelines "Precocious puberty". *Problemy endokrinologii = Problems of Endocrinology*, 2021, Vol. 67, no. 5, pp. 84-103. (In Russ.)]
2. Amino N., Hidaka Y., Takano T., Tatsumi K., Izumi Y., Nakata Y. Possible induction of Graves' disease and painless thyroiditis by gonadotropin-releasing hormone analogues. *Thyroid*, 2003, Vol. 13, no. 8, pp. 815-818.
3. Berntorp K., Frid A., Alm R., Fredrikson G.N., Sjöberg K., Ohlsson B. Antibodies against gonadotropin-releasing hormone (GnRH) in patients with diabetes mellitus is associated with lower body weight and autonomic neuropathy. *BMC Res. Notes*, 2013, Vol. 6, no. 1, 329. doi: 10.1186/1756-0500-6-329.

4. Eyal O., Rose S.R. Autoimmune thyroiditis during leuprolide acetate treatment. *J. Pediatr.*, 2004, Vol. 144, no. 3, pp. 394-396.
5. Krstevska-Konstantinova M., Jancevska A., Gucev Z. Autoimmune thyroiditis and diabetes mellitus type 1 after long-term gonadotropin-releasing hormone agonist treatment for central precocious puberty: evolution or coincidence? *J. Pediatr. Endocrinol. Metab.*, 2010, Vol. 23, no. 4, pp. 403-406.
6. Metcalfe W., Boulton-Jones J.M. Exacerbation of lupus nephritis in association with leuprorelin injection for uterine leiomyoma. *Nephrol. Dial. Transplant.*, 1997, Vol. 12, no. 8, pp. 1699-1700.
7. Naderi F., Soheilrad Z., Haghshenas Z. The influence of gonadotropin-releasing hormone agonist treatment on thyroid function tests in children with central idiopathic precocious puberty. *Med. Arch.*, 2019, Vol. 73, no. 2, pp. 101-103.
8. Rakab A., Motawea K.R., Rozan S., Mahmoud Hamouda H., Alibrahim H., Elsayed Talat N., Elhalag R., Sawaf B., Mohamed G., Albozom A., Swed S., Mohamed Abuelsaoud H., Mohamed Elshazly R., Hafez W. Association between diabetes and immunoglobulin M antibodies against endogenous gonadotropin-releasing hormone in serum: a meta-analysis. *Cureus*, 2022, Vol. 14, no. 11, e31415. doi:10.7759/cureus.31415.
9. Wang L., Wu J., Cao H., Chen R., Zhang N., Fu J., Gao B., Zhang J., Hou R., Tang C., Ji Q. The correlation between intestinal gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and proglucagon in hyperlipidemic rats and gotokakizaki (GK) rats. *Endocr. Pathol.*, 2009, Vol. 20, no. 4, pp. 227-234.
10. Wang X., Zhong L., Liu Q., Cai P., Zhang P., Lu Z., Li X., Liu J. Activation of gonadotropin-releasing hormone receptor impedes the immunosuppressive activity of decidual regulatory T cells via deactivating the mechanistic target of rapamycin signaling. *Immunol Invest.*, 2022, Vol. 51, no. 5, pp. 1330-1346.
11. Zakharova L., Sharova V., Izvolskaia M. Mechanisms of reciprocal regulation of gonadotropin-releasing hormone (gnrh)-producing and immune systems: the role of GnRH, cytokines and their receptors in early ontogenesis in normal and pathological conditions. *Int. J. Mol. Sci.*, 2020, Vol. 22, no. 1, 114. doi: 10.3390/ijms22010114.

Авторы:

Хисамутдинова Д.Р. — аспирант кафедры клинической микологии, аллергологии и иммунологии ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Козлова Я.И. — к.м.н., доцент кафедры клинической микологии, аллергологии и иммунологии ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Башнина Е.Б. — д.м.н., профессор кафедры эндокринологии имени академика В.Г. Баранова ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Authors:

Khislamutdinova D.R., Postgraduate Student, Department of Clinical Mycology, Allergology and Immunology, I. Mechnikov North-Western State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Kozlova Ya.I., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Clinical Mycology, Allergology and Immunology, I. Mechnikov North-Western State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Bashnina E.B., PhD, MD (Medicine), Professor, V. Baranov Department of Endocrinology, I. Mechnikov North-Western State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Фролова Е.В. — к.м.н., заведующая НИЛ иммунологии и аллергологии ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Frolova E.V., PhD (Medicine), Head, Laboratory of Immunology and Allergology, I. Mechnikov North-Western State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Учеваткина А.Е. — к.м.н., старший научный сотрудник НИЛ иммунологии и аллергологии ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Uchevatkina A.E., PhD (Medicine), Senior Research Associate, Laboratory of Immunology and Allergology, I. Mechnikov North-Western State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Филিপпова Л.В. — к.м.н., старший научный сотрудник НИЛ иммунологии и аллергологии ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Filippova L.V., PhD (Medicine), Senior Research Associate, Laboratory of Immunology and Allergology, I. Mechnikov North-Western State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Васильева Н.В. — д.б.н., профессор, директор НИИ медицинской микологии имени П.Н. Кашкина ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Vasilyeva N.V., PhD, MD (Biology), Professor, Director of P. Kashkin Research Institute of Medical Mycology, I. Mechnikov North-Western State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Поступила 10.07.2023
Принята к печати 12.07.2023

Received 10.07.2023
Accepted 12.07.2023

КЛИНИЧЕСКИЙ СЛУЧАЙ ВТОРИЧНОЙ ЭОЗИНОФИЛИИ У РЕБЕНКА

Мухаметзянова В.Г.¹, Рыбакова О.Г.², Пальченко П.М.³,
Петрунина С.Ю.²

¹ Медицинский центр аллергологии и иммунологии «Авиценна», г. Челябинск, Россия

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

³ ГБУЗ «Детская городская клиническая больница № 7» г. Челябинск, Россия

Резюме. Пару десятилетий назад диагностический поиск причины эозинофилии крови проводился либо в сторону большой тройки аллергических заболеваний (бронхиальная астма, аллергический ринит, атопический дерматит), либо паразитарной инвазии, в последние годы в практике врачей различных специальностей все чаще встречаются более сложные клинические синдромы, от реактивной (вторичной) эозинофилии до эозинофильной лейкемии. Цель статьи – демонстрация клинического случая вторичной эозинофилии у ребенка с минимальными клиническими проявлениями. Порой эозинофилия крови у пациента бывает «неожиданной находкой» для врача, особенно, если жалобы скудные, неспецифичные и объективный осмотр не выявляет выраженных отклонений в здоровье. В представленном клиническом случае диагностирована вторичная (реактивная) эозинофилия периферической крови, причиной которой явилось поражение кишечника, индуцированное пищевыми аллергенами. Данный клинический случай представляет практический интерес для врачей, демонстрирует диагностический поиск причины эозинофилии крови, которой в итоге явилась смешанная IgE/не-IgE-опосредованная пищевая аллергия, проявляющаяся аллергическим энтероколитом. Об IgE-опосредованном механизме пищевой аллергии свидетельствует высокий уровень IgE и его снижение на фоне элиминационной диеты, замедленный тип реакции и слабая выраженность клинических проявлений пищевой аллергии, эозинофилия в ОАК свидетельствуют о не-IgE опосредованной пищевой аллергии. Особенностью данного случая является выраженность лабораторных изменений (эозинофилия ОАК, значимое повышение уровней специфических IgE) при скудной клинической симптоматике со стороны кишечника, тогда как чаще всего, особенно у детей раннего возраста, наблюдается противоположная ситуация – яркая клиническая картина энтероколита при отсутствии изменений лабораторных показателей.

Ключевые слова: дети, эозинофилия периферической крови, аллергический энтероколит, пищевая аллергия, сенсibilизация к пищевым аллергенам

Адрес для переписки:

Рыбакова Ольга Геннадьевна
ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный
медицинский университет» Министерства
здравоохранения РФ
454092, Россия, г. Челябинск, ул. Воровского, 64.
Тел.: 8 (951) 260-47-63.
E-mail: gallo53@mail.ru

Address for correspondence:

Olga G. Rybakova
South Ural State Medical University
64 Vorovsky St
Chelyabinsk
454092 Russian Federation
Phone: +7 (951) 260-47-63.
E-mail: gallo53@mail.ru

Образец цитирования:

В.Г. Мухаметзянова, О.Г. Рыбакова, П.М. Пальченко,
С.Ю. Петрунина «Клинический случай
вторичной эозинофилии у ребенка» // Российский
иммунологический журнал, 2023. Т. 26, № 4. С. 559-566.
doi: 10.46235/1028-7221-13828-ACC

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

For citation:

V.G. Mukhametzyanova, O.G. Rybakova, P.M. Palchenko,
S.Yu. Petrunina "A clinical case of secondary eosinophilia
in a child", Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy
Immunologicheskii Zhurnal, 2023, Vol. 26, no. 4, pp. 559-566.
doi: 10.46235/1028-7221-13828-ACC

© Mukhametzyanova V.G. et al., 2023
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.46235/1028-7221-13828-ACC

A CLINICAL CASE OF SECONDARY EOSINOPHILIA IN A CHILD

Mukhametzyanova V.G.^a, Rybakova O.G.^b, Palchenko P.M.^c,
Petrunina S.Yu.^b

^a Medical Center of Allergology and Immunology "Avicenna", Chelyabinsk, Russian Federation

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

^c Pediatric Municipal Clinical Hospital No. 7, Chelyabinsk, Russian Federation

Abstract. A couple of decades ago, the diagnostic search for the cause of blood eosinophilia concerned, mainly, the three major allergic diseases (bronchial asthma, allergic rhinitis, atopic dermatitis), or parasitic invasion. In recent years, more and more complex clinical syndromes, from reactive (secondary) eosinophilia to eosinophilic leukemia are increasingly considered by the doctors of different specialties. The aim of our work was to present a clinical case of secondary eosinophilia in a child with minimal clinical manifestations. Highlights: Sometimes blood eosinophilia in a patient is an "unexpected finding" for a physician, especially if the complaints are scanty, nonspecific, and objective examination does not reveal any significant health abnormalities. In the presented case, secondary (reactive) peripheral blood eosinophilia was diagnosed due to intestinal damage induced by food allergens. This clinical case is of practical interest to physicians, presenting a diagnostic search for the cause of blood eosinophilia, which eventually proved to be a mixed IgE/non-IgE mediated food allergy manifesting as allergic enterocolitis. The IgE-mediated mechanism of food allergy is evidenced by a high level of IgE and its decrease with administered elimination diet; delayed-type response and low severity of clinical manifestations of food allergy, as well as blood eosinophilia suggest a non-IgE mediated food allergy. In this particular case, the severity of laboratory changes (blood eosinophilia, a significant increase in the levels of specific IgE) was associated with scarce intestinal symptoms. An opposite situation is observed, especially, in young children where the disease manifests with a pronounced clinical pattern of enterocolitis in the absence of laboratory changes.

Keywords: children, peripheral blood eosinophilia, allergic enterocolitis, food allergy, food allergens, sensitization

Введение

Пациент с повышенным уровнем эозинофилов ($> 0,5 \times 10^9/\text{л}$) в периферической крови всегда попадает в поле зрения врача. По данным популяционных исследований частота встречаемости эозинофилии периферической крови составляет 4-7% [6, 7, 10, 14, 15]. Если пару десятилетий назад диагностический поиск причины проводился либо в сторону большой тройки аллергических заболеваний (бронхиальная астма, аллергический ринит, атопический дерматит), либо паразитарной инвазии [1, 11, 12], то в последние годы в практике врачей различных специальностей все чаще встречаются более сложные клинические синдромы, от реактивной (вторичной) эозинофилии до эозинофильной лейкемии [1, 7, 13]. Таким образом, определение причины эозинофилии является первостепенной задачей лечащего врача, так как это будет влиять на лечение и прогноз заболевания. Цель — демонстрация подробного дифференциально-диагностического подхода к постановке диагноза и медицинского сопровождения пациента с эозинофилией крови

на примере клинического случая вторичной эозинофилии у ребенка.

Материалы и методы

Материалом для анализа клинического случая послужили медицинские документы (форма № 112/у), результаты клинического обследования, осмотров узких специалистов и лабораторных исследований. Длительность проспективного наблюдения за пациентом составила 2 года.

Результаты и обсуждение

Девочка А., 4 года. Мама обратилась к врачу-педиатру с жалобами на кашицеобразный стул у ребенка 1-2 раза в день в течение 3 недель, периодическую боль в животе перед дефекацией, которая проходила после опорожнения кишечника, изменения в общем анализе крови, который они без назначения врача сдали самостоятельно, в виде лейкоцитоза до $21,27 \times 10^9/\text{л}$ и эозинофилии 45%.

Анамнез заболевания: 3 недели назад ребенок перенес острую кишечную инфекцию легкой степени тяжести неуточненной этиологии. Диагноз был выставлен врачом-педиатром на основании клинико-эпидемиологических данных. В начале заболевания отмечалась однократная рвота, разжиженный стул (6-й тип по Бристольской шкале) до 2 раз в сутки, повышение температуры до 37,3 °С в течение 2 дней, в это же время отмечалось снижение аппетита у ребенка. На 5-й день заболевания разжиженный стул до 2 раз в сутки сохранялся, появились элементы уртикарной сыпи по типу крапивницы на туловище и конечностях, которые купировались после назначения антигистаминного препарата второго поколения на следующий день, при этом самочувствие ребенка не страдало. До заболевания стул у пациента был 1 раз в 1-2 дня, оформленный, коричневый. За пределы города и страны ребенок в течение предшествующих 6 месяцев не выезжал.

Объективно. Состояние ребенка на момент осмотра удовлетворительное. Самочувствие не нарушено. Кожные покровы с бледным оттенком, умеренной влажности, сыпи нет. Подкожно-жировой слой выражен незначительно, распределен равномерно. Тургор мягких тканей сохранен. Периферические лимфатические узлы пальпируются подчелюстные, передние шейные, до 1 см в диаметре, эластичные, безболезненные. Язык у корня незначительно обложен белым налетом, видимые слизистые розовые, влажные, миндалины не увеличены. Носовое дыхание не затруднено. В легких дыхание пуэрильное, проводится по всем легочным полям, хрипов нет. ЧДД 24. Границы сердца в пределах возрастной нормы, тоны сердца ясные, дыхательная аритмия. ЧСС 110. Живот правильной формы, мягкий, при глубокой пальпации отмечается урчание по ходу подвздошной и поперечно-ободочной кишки. Правая доля печени выступает из-под края реберной дуги по среднеключичной линии на 1,5 см, край эластичный, безболезненный, пузырьные симптомы отрицательные. Селезенка не пальпируется. Со слов мамы, мочеиспускание не затруднено, моча светлая. Физическое развитие соответствовало возрасту (рост -0,67 SD; ИМТ -0,19 SD).

Анамнез жизни. У матери 3 беременности (1 беременность – рождение ребенка, 2 – выкидыш, 3 – рождение ребенка, пробанд). Данная беременность протекала на фоне ХФПН, анемии легкой степени тяжести. Роды 2-е своевременные, самостоятельные, в головном предлежании плода, на сроке 39 недель. Девочка родилась с массой тела 3200 г, длиной тела – 50 см, окружно-

стью головы – 34 см, что соответствовало сроку гестации. Оценка по шкале Апгар – 8/9 баллов. К груди приложена в родильном зале. Период адаптации новорожденного протекал без особенностей, на третьи сутки появилась физиологическая желтуха, которая ко 2-й неделе жизни прошла. На естественном вскармливании ребенок находился до 1 месяца, прибавил 800 грамм. При переводе ребенка на адаптированную молочную смесь вследствие отсутствия молока у матери появилась клиника непереносимости белков коровьего молока: срыгивания после кормления, стул водянистый после каждого кормления, ребенок становился беспокойным, гиперемия щек и папулезные высыпания на коже рук и ног. Пациенту была подобрана специализированная смесь на основе высокогидролизованного молочного белка, после чего вышеуказанные клинические проявления купировались. До года продукты прикорма, содержащие белок коровьего молока, не вводились. Вес в 1 год 10 кг. После года проводилось расширение диеты, постепенное введение в рацион молочных продуктов и молока, со слов мамы, изменения характера стула, болей в животе, высыпаний на коже не было. Ребенок рос и развивался соответственно возрасту, респираторными заболеваниями на 1-м году болел 2 раза, на 2-м году раз в 3 месяца, в 3 года был оформлен в детское дошкольное учреждение, болеть стал чаще, в первые полгода практически ежемесячно, но все эпизоды респираторной инфекции протекали легко в виде острого ринофарингита. В данный момент респираторными заболеваниями болеет в легкой форме, 1 раз в 2-3 месяца, с мая по сентябрь не болела. В 3 года перенесла ветряную оспу. Профилактические прививки проведены согласно национальному календарю вакцинации. По данным формы 112, общий анализ крови (ОАК) сдавался в 3 мес., 12 мес. и в 3 года перед оформлением в садик. Показатели красного и белого ростка кроветворения, лейкоцитарная формула соответствовали возрасту, анемии, эозинофилии не было.

Наследственность отягощена по язвенной болезни желудка и желчнокаменной болезни. Отягощен семейный аллергологический анамнез. У мамы клинические проявления риноконъюнктивита при контакте с шерстью кошки, обследование не проходила, базисную терапию не получила, при избегании контакта с кошками ничего не беспокоило.

Перед врачом-педиатром стояла непростая задача – провести диагностический поиск и определить причину эозинофилии у ребенка. В соответствии с клиническими рекомендациями [1, 7]

ТАБЛИЦА 1. ДИНАМИКА ПОКАЗАТЕЛЕЙ ОБЩЕГО АНАЛИЗА КРОВИ ПАЦИЕНТА

TABLE 1. DYNAMICS OF PARAMETERS OF THE GENERAL BLOOD TEST OF THE PATIENT

Гемоглобин (110-140 г/л) Hemoglobin (110-140 g/L)	Эритроциты 3,5-4,5 × 10 ¹² /л Red blood cells (3,5-4,5 × 10 ¹² /L)	Лейкоциты (5-14,5 × 10 ⁹ /л) White blood cell (5-14,5 × 10 ⁹ /L)	Эозинофилы (0-0,7 × 10 ⁹ /л) Eosinophils (0-0,7 × 10 ⁹ /L) 1-6%	Нейтрофилы (1,5-8,0 × 10 ⁹ /л) Neutrophils (1,5-8,0 × 10 ⁹ /L) 32-55%	Лимфоциты (1,5-7,0 × 10 ⁹ /л) Lymphocytes (1,5-7,0 × 10 ⁹ /L) 26-60%	Моноциты (0-0,8 × 10 ⁹ /л) Monocytes (0-0,8 × 10 ⁹ /L) 2-10%	Тромб. (189-394 × 10 ⁹ /л) Platelets (189-394 × 10 ⁹ /L)	СОЭ До 10 мм/ч ESR < 10 mm/h
На момент обращения At the time of contacting the doctor								
125	4,29	21,27	9,57 (45%)	2,98 (14%)	7,66 (36%)	1,06 (5%)	460,0	8
Через 10 дней после обращения и лечения у педиатра 10 days after pediatric treatment								
129	4,38	34,24	17,15 (50%)	8,7 (25%)	6,8 (20%)	1,59 (5%)	162,7	7
Через 14 дней после лечения препаратом Альбендазол 14 days after treatment with Albendazole								
124	4,0	31,29	21,28 (68%)	1,56 (5%)	7,2 (23%)	1,25 (4%)	180,0	7
На фоне соблюдения элиминационной диеты через 14 дней 14 days after starting the elimination diet								
116	3,83	18,9	6,8 (36%)	3,6 (19%)	7,56 (40%)	0,94 (5%)	180,0	2

Примечание. В первой строчке показатели общего анализа крови и их референсные значения в абсолютных и относительных величинах.

Note. In the first line, the parameters of the general blood test and their reference values in absolute and relative values.

пациенту было проведено представленное ниже обследование. ОАК (см. табл. 1 «на момент обращения»). Комментарий: выраженное повышение уровня лейкоцитов за счет повышения уровня эозинофилов, нет сдвига в лейкоцитарной формуле, анемии, тромбоцитопении, что позволяло на данном этапе исключить миелопролиферативный процесс.

В общем анализе мочи изменений не было. Копрограмма была проведена с целью исследования органов пищеварения и функции желудочно-кишечного тракта: рН-6,0, в небольшом количестве обнаружены мышечные волокна с исчерченностью и без исчерченности, жирные кислоты, растительная клетчатка неперевариваемая, растительная клетчатка перевариваемая,

крахмал внутриклеточно – немного. Кристаллы Шарко–Лейдена в умеренном количестве, слизь в умеренном количестве. Комментарий: кристаллы Шарко–Лейдена указывали на аллергическое воспаление слизистой оболочки кишечника. Бактериологическое исследование кала – роста патогенной флоры нет.

Для исключения глистной инвазии и простейших – одной из самых частых причин реактивной (вторичной) эозинофилии – было проведено исследование: анализ кала на яйца гельминтов методом PARASEP – отриц.; кал на антиген лямблий (ПЦР) – не обнаружен; исследование на энтеробиоз (шпатель) – отриц. Метод ИФА Anti – Trichinella IgG – отриц., anti-Echinococcus IgG – отриц., anti-Toxocara IgG –

отриц., anti-Ascaris IgG – отриц. Таким образом, по результатам проведенного исследования не были выявлены глистная инвазия и лямблиоз.

Биохимические показатели крови (в круглых скобках представлены референсные значения): общ. билирубин – 2,5 мкмоль/л (до 20,5 мкмоль/л), АСТ – 12 Ед/л (до 37 Ед/л), АЛТ – 38 Ед/л (до 40 Ед/л), щелочная фосфатаза – 165 Ед/л (141-460 Ед/л), ЛДГ – 141 Ед/л (< 279 Ед/л), мочевины – 4,3 ммоль/л (2,5-8,3 ммоль/л), креатинин – 64 мкмоль/л (60-130 мкмоль/л), глюкоза – 4,9 ммоль/л (3,3-5,5 ммоль/л), амилаза – 54 Ед/л (25-125 Ед/л), общий белок – 64 г/л (60-80 г/л), СРБ – 0,23 мг/л (0-1 мг/л). Отклонений в биохимических показателях крови выявлено не было.

Узи органов брюшной полости и почек: выявленная гепатоспленомегалия без нарушения эхогенности ткани и сосудистого рисунка органов, по данным УЗИ, без признаков гиперспленизма (тромбоцитопения, эритроцитопения, лейкопения), по данным клинического анализа крови, может быть расценена как вторичная либо постинфекционная, либо на фоне аллергической реакции.

Данные анамнеза, осмотра, проведенного обследования были трактованы врачом-педиатром как возможное проявление пищевой аллергии, были назначены: гипоаллергенная диета (с исключением шоколада, какао, конфет, цитрусовых, фруктов и ягод красной и оранжевой окраски, меда) и медикаментозное лечение: сорбент, антигистаминный препарат второго поколения, курсом на 7 дней, также назначено дообследование.

Через 10 дней пациент пришел на прием повторно, меньше стали беспокоить боли в животе перед дефекацией, на фоне приема сорбента стул стал гуще, но после отмены все симптомы вернулись. Контрольные анализы через 10 дней после обращения к педиатру (см. табл. 1). Копрограмма: рН – 8,0, кристаллы Шарко–Лейдена в умеренном количестве, слизь в умеренном количестве. Комментарий: отмечалось повторное выявление кристаллов Шарко–Лейдена, что однозначно указывало на персистирующее аллергическое воспаление слизистой оболочки кишечника [9], следующей задачей явилось определение его причины.

Ребенок проконсультирован врачом-инфекционистом (паразитологом), учитывая изменение характера стула, эпизод крапивницы в анамнезе, отсутствие эффекта от гипоаллергенной диеты, увеличение количества эозинофилов в общем анализе крови, рекомендован курс Аль-

бендазола для проведения терапии *ex juvantibus*, несмотря на то, что лабораторных данных, подтверждающих глистную инвазию и протозоозы, не выявлено [4]. Через 2 недели после проведенного лечения было рекомендовано проконтролировать ОАК, с целью оценки динамики показателя эозинофилов (см. табл. 1).

Сохранялись жалобы на жидкий стул 1-2 раза в день, 6-й тип по Бристольской шкале. Сохранялись периодические боли в животе, урчание перед дефекацией. Кроме того, обращало на себя внимание стойкое снижение аппетита (ребенок стал кушать неохотно). Температура не повышалась. Учитывая сохраняющиеся жалобы и выраженную эозинофилию в ОАК с тенденцией к ее увеличению в динамике, для исключения гематологического заболевания и заболеваний желудочно-кишечного тракта ребенок был направлен на консультацию к гематологу и гастроэнтерологу.

Консультация врача-гематолога. Диагноз: «эозинофилия неуточненная». D72.1. Рекомендована консультация врача – аллерголога-иммунолога.

Консультация детского гастроэнтеролога. Предварительный диагноз: исключить целиакию. Вторичная лактазная недостаточность после перенесенной кишечной инфекции. Обследование на целиакию: АТ к тканевой трансглутаминазе IgA, АТ к эндомизию IgA, АТ к деамид. пептидам глиадина IgA – отриц. Отсутствие вышеуказанных антител с большой вероятностью исключало диагноз «целиакия» [3]. Фекальный кальпротектин – 117,5 мкг/г (50-200 мкг/г – умеренное повышение), повышение этого показателя свидетельствовало о воспалительных изменениях в слизистой оболочке кишечника.

Аллергологическое обследование: Яичный белок IgE – 32,1 kU/L (класс 4); Яичный желток IgE > 100 kU/L (класс 6); Коровье молоко IgE – 2,71 kU/L (класс 2); Альфа-лактоальбумин IgE – 4,85 kU/L (класс 3); Бета-лактоглобулин IgE – 18,6 kU/L (класс 4); Пшеничная мука IgE – 48,4 kU/L (класс 4); Соевые бобы IgE – 2,02 kU/L (класс 2); Фундук IgE – 4,15 kU/L (класс 3).

Ребенок проконсультирован аллергологом-иммунологом: данных за первичный иммунодефицит нет. У пациента выявлена клинически значимая сенсibilизация к антигенам яичного белка, желтка, бета-глобулину молока, пшеничной муки, пассивная сенсibilизация к антигену собаки (в анамнезе при контакте с собаками не было клинических проявлений аллергии). Дома животных у пациента нет. Рекомендовано соблюдать элиминационную диету (исключение про-

дуктов, содержащих пшеничную муку, молоко, яйца).

После начала соблюдения элиминационной диеты в течение 3 дней стул у ребенка нормализовался, что соответствует общеизвестному факту — выраженность симптомов гастроинтестинальной формы пищевой аллергии значительно снижается в течение 72 часов после элиминации аллергена [2, 5, 8].

Через 2 недели в ОАК отмечалась тенденция к снижению уровня лейкоцитов (18,9 тыс/мкл) и эозинофилов (6,8 тыс/мкл) (см. табл. 1). Далее через 1, 3, 4 месяца с момента начала соблюдения элиминационной диеты уровень эозинофилов ОАК составил 30%, 20% и 14% соответственно. Кристаллы Шарко–Лейдена в копрограмме перестали определяться.

После снижения уровня эозинофилов в ОАК мама ребенка самостоятельно решила вернуть в рацион питания продукты, содержащие пшеницу и яйцо. Через 2 недели после введения аллергенов в ОАК вновь отмечался рост уровня эозинофилов до 26%, таким образом, мы получили информацию по диагностическому введению продукта и подтверждение факта вторичности (реактивности) эозинофилии крови, появившейся вслед-

ствие интестинальной формы пищевой аллергии. Через 2 месяца на фоне соблюдения диеты уровень эозинофилов ОАК снизился до 7%. Далее в течение двух лет наблюдения на фоне соблюдения элиминационных мероприятий уровень эозинофилов ОАК колебался в пределах 7-9%, жалоб не было. Исследование специфических IgE к антигенам яйца, пшеницы, бета-лактоглобулину молока через год от начала соблюдения диеты выявило снижение уровней до 3 класса.

Заключение

Данный клинический случай представляет практический интерес для врачей, демонстрирует диагностический поиск причины эозинофилии крови, которой в итоге явилась смешанная IgE/не-IgE опосредованная пищевая аллергия, проявляющаяся аллергическим энтероколитом. Об IgE-опосредованном механизме пищевой аллергии свидетельствует высокий уровень IgE и его снижение на фоне элиминационной диеты, замедленный тип реакции и слабая выраженность клинических проявлений пищевой аллергии, эозинофилия в ОАК свидетельствуют о не-IgE-опосредованной пищевой аллергии [2, 5, 8].

Список литературы / References

1. Горячкина Л.А., Терехова Е.П. Идиопатический гиперэозинофильный синдром // Эффективная фармакотерапия. Аллергология и иммунология, 2012. Т. 1, № 6. С. 56-62. [Goryachkina L.A., Terekhova E.P. Idiopathic hypereosinophilic syndrome. Effective pharmacotherapy. *Allergologiya i immunologiya = Allergology and Immunology*, 2012, Vol. 1, no. 6, pp. 56-62. (In Russ.)]
2. Камалова А.А., Гарина Г.А. Эозинофильный колит у детей // Педиатрия им. Г.Н. Сперанского, 2020. Т. 99, № 5. С. 149-154. [Kamalova A.A., Garina G.A. Eosinophilic colitis in children. *Pediatrics im. G.N. Speranskogo = Pediatrics. G. Speransky*, 2020, Vol. 99, no. 5, pp. 149-154. (In Russ.)]
3. Климов Л.Я., Курьянинова В.А., Черкасова Е.А., Стоян М.В., Ивенская Т.А., Ягупова А.В., Миронова Я.Д., Кочнева Л.Д. Патологические реакции на глютен у детей: определение, классификация, клинико-серологическая характеристика // West Kazakhstan Medical Journal, 2021. Т. 63, № 4. С. 192-198. [Cherkasova E.A., Stoyan M.V., Ivenskaya T.A., Yagupova A.V., Mironova Ya.D., Kochneva L.D. Pathological reactions to gluten in children: definition, classification, clinical and serological characteristics. *West Kazakhstan Medical Journal = West Kazakhstan Medical Journal*, 2021, Vol. 63, no. 4, pp. 192-198. (In Russ.)]
4. Кочергина Е.А., Корюкина И.П., Зубов Е.В. Особенности лечения паразитарных заболеваний // РМЖ, 2004. Т. 13. С. 815. [Kochergina E.A., Koryukina I.P., Zubov E.V. Features of the treatment of parasitic diseases. *RMZh = Russian Medical Journal*, 2004, Vol. 13, p. 815. (In Russ.)]
5. Мачарадзе Д.Ш. Пищевая аллергия у детей и взрослых: клиника, диагностика, лечение. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2017. 392 с. [Macharadze D.Sh. Food allergy in children and adults: clinic, diagnosis, treatment]. Moscow: GEOTAR-Media, 2017. 392 p.
6. Немцов Л.М., Юпатов Г.И., Гавриленко Л.А., Млявый А.Н., Косинец Н.С., Хвощёв А.В. Эозинофильная патология толстого кишечника // Вестник ВГМУ, 2018. Т. 17, № 4. С. 7-21. [Nemtsov L.M., Yupatov G.I., Gavrilenko L.A., Mlyavyy A.N., Kosinets N.S., Khvoshchev A.V. Eosinophilic pathology of the large intestine. *Vestnik VGMU = Bulletin of Vitebsk State Medical University*, 2018, Vol. 17, no. 4, pp. 7-21. (In Russ.)]
7. Немченко И.С., Цыба Н.Н., Туркина А.Г., Чельшева Е.Ю., Шухов О.А., Ковригина А.М., Обухова Т.Н. Диагностика и лечение клональных миелопролиферативных заболеваний, протекающих с эозинофилией // Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика, 2020. Т. 13, № 2. С. 161-169. [Nemchenko I.S., Tsyba N.N., Turkina A.G., Chelysheva E.Yu., Shukhov O.A., Kovrigina A.M., Obukhova T.N. Diagnosis and treatment of clonal myeloproliferative diseases, progressing with eosinophilia // *Clinical Hematology. Fundamental Research and Clinical Practice*, 2020, Vol. 13, no. 2, pp. 161-169. (In Russ.)]

Kovrigina A.M., Obukhova T.N. Diagnosis and treatment of clonal myeloproliferative diseases with eosinophilia. Clinical oncohematology. *Klinicheskaya onkogematologiya. Fundamentalnye issledovaniya i klinicheskaya praktika = Clinical Oncohematology. Basic Research and Clinical Practice*, 2020, Vol. 13, no. 2, pp. 161-169. (In Russ.)]

8. Печкуров Д.В., Тяжева А.А., Коновалова А.М., Липатова Е.С. Маски пищевой аллергии у детей // Практическая медицина, 2018. Т. 2, № 113. С. 5-10. [Pechkurov D.V., Tyazheva A.A., Konovalova A.M., Lipatova E.S. Food allergy masks in children. *Prakticheskaya meditsina = Practical Medicine*, 2018, Vol. 2, no. 113, pp. 5-10. (In Russ.)]

9. Приходченко Н.Г., Шуматова Т.А., Папчук А.Е., Григорян Л.А., Быкова А.Д. Эозинофилы кала и эозинофильный катионный протеин у детей с пищевой аллергией // Российский педиатрический журнал, 2021. Т. 24, № 4. С. 273. [Prikhodchenko N.G., Shumatova T.A., Papchuk A.E., Grigoryan L.A., Bykova A.D. Fecal eosinophils and eosinophilic cationic protein in children with food allergies. *Rossiyskiy pediatricheskiy zhurnal = Russian Pediatric Journal*, 2021, Vol. 24, no. 4, p. 273. (In Russ.)]

10. Туркина А.Г., Немченко И.С., Челышева Е.Ю., Гусарова Г.А., Хорошко Н.Д., Абдулкадыров К.М., Голеньков А.К., Горячева С.Р., Зарицкий А.Ю., Ковригина А.М., Куцев С.И., Ломаиа Е.Г., Мартынкевич И.С., Меликян А.Л., Обухова Т.Н., Поспелова Т.И., Шуваев В.А. Национальные клинические рекомендации. Диагностика и лечение миелопролиферативных заболеваний с эозинофилией и идиопатического гиперэозинофильного синдрома // Гематология и трансфузиология, 2016. Т. 61, № 1 (Прил. 3). С. 1-24. [Turkina A.G., Nemchenko I.S., Chelysheva E.Yu., Gusarova G.A., Khoroshko N.D., Abdulkadyrov K.M., Golenkov A.K., Goryacheva S.R., Zaritskiy A.Yu., Kovrigina A.M., Kutsev S.I., Lomaia E.G., Martynkevich I.S., Melikyan A.L., Obukhova T.N., Pospelova T.I., Shuvaev V.A. National Clinical Recommendations. Diagnosis and treatment of myeloproliferative diseases with eosinophilia and idiopathic hypereosinophilic syndrome. *Gematologiya i transfuziologiya = Hematology and Transfusiology* 2016, Vol. 61, no. 1 (Suppl. 3), pp. 1-24. (In Russ.)]

11. Федоров И.А., Рыбакова О.Г. Персистенция эозинофильного фенотипа при легком течении бронхиальной астмы у детей дошкольного возраста // Доктор.Ру, 2019. Т. 5, № 160. С. 47-51. [Fedorov I.A., Rybakova O.G. Persistence of the eosinophilic phenotype in mild bronchial asthma in preschool children. *Doktor.Ru = Doctor.Ru*, 2019, Vol. 5, no. 160, pp. 47-51. (In Russ.)]

12. Butt N.M., Lambert J., Ali S., Beer P.A., Cross N.C.P., Duncombe A., Ewing J., Harrison C.N., Knapper S., McLornan D., Mead A.J., Radia D., Bain B.J.; British Committee for Standards in Haematology British Committee for Standards in Haematology. Guideline for the investigation and management of eosinophilia. *Br. J. Haematol.*, 2017, Vol. 176, no. 4, pp. 553-572.

13. Shomali W. Gotlib J. World Health Organization-defined eosinophilic disorders: 2022 update on diagnosis, risk stratification, and management. *Am. J. Hematol.*, 2022, Vol. 97, no. 1, pp. 129-148.

14. Valent P., Klion A.D., Horny H.P., Roufosse F., Gotlib J., Weller P.F., Hellmann A., Metzgeroth G., Leiferman K.M., Arock M., Butterfield J.H., Sperr W.R., Sotlar K., Vandenberghe P., Haferlach T., Simon H.-U., Reiter A., Gleich G.J. Contemporary consensus proposal on criteria and classification of eosinophilic disorders and related syndromes. *J. Allergy Clin. Immunology*, 2012, Vol. 130, no. 3, pp. 607-612.

15. Wechsler M.E., Munitz A., Ackerman S.J., Drake M.G., Jackson D.J., Wardlaw A.J., Dougan S.K., Berdnikovs S., Schleich F., Matucci A., Chanez P., Prazma C.M., Howarth P., Weller P.F., Merkel P.A. Eosinophils in health and disease: a state-of-the-art review. *Mayo Clin. Proc.*, 2021, Vol. 96, no. 10, pp. 2694-2707.

Авторы:

Мухаметзянова В.Г. — к.м.н., врач — аллерголог-иммунолог высшей квалификационной категории, Медицинский центр аллергологии и иммунологии «Авиценна», г. Челябинск, Россия

Рыбакова О.Г. — к.м.н., доцент кафедры пропедевтики детских болезней и педиатрии ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Челябинск, Россия

Authors:

Mukhametzhanova V.G., PhD (Medicine), Allergist-Immunologist, Medical Center of Allergology and Immunology “Avicenna”, Chelyabinsk, Russian Federation

Rybakova O.G., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Propaedeutics of Children’s Diseases and Pediatrics, South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

Пальченко П.М. — врач-педиатр высшей квалификационной категории ГБУЗ «Детская городская клиническая больница № 7» г. Челябинск, Россия

Palchenko P.M., Pediatrician, Pediatric Municipal Clinical Hospital No. 7, Chelyabinsk, Russian Federation

Петрунина С.Ю. — к.м.н., врач-гастроэнтеролог, доцент кафедры пропедевтики детских болезней и педиатрии ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Челябинск, Россия

Petrulina S.Yu., PhD (Medicine), Gastroenterologist, Associate Professor, Department of Propaedeutics of Children's Diseases and Pediatrics, South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

Поступила 10.07.2023
Принята к печати 12.07.2023

Received 10.07.2023
Accepted 12.07.2023

СОДЕРЖАНИЕ МАТРИКСНОЙ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗЫ 2-ГО ТИПА (ММР-2) И КОМПЛЕКСОВ ММР-9/ТИМР-1, ММР-2/ТИМР-2 И ОБЩЕГО ХОЛЕСТЕРИНА У ПРАКТИЧЕСКИ ЗДОРОВЫХ ЛЮДЕЙ И ПАЦИЕНТОВ С АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИЕЙ

**Чепурнова Н.С.¹, Кныш С.В.¹, Ющук В.Н.¹, Маркелова Е.В.¹,
Санацкий К.Р.¹, Ющенко А.Н.¹, Ермолицкая М.З.²**

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

² ФГБУН «Институт автоматики и процессов управления» Дальневосточного отделения Российской
академии наук, г. Владивосток, Россия

Резюме. Артериальная гипертензия (АГ) является самым распространенным возраст-ассоциированным заболеванием среди трудоспособного населения. Полиэтиологичность АГ диктует необходимость более тщательного определения и изучения ее предикторов для понимания роли внешних воздействий, а также установления наследственных полиморфизмов на ранних этапах с целью ограничения их реализации. В научных обзорах обсуждается важная роль аномального ремоделирования сосудов в патогенезе развития артериальной гипертензии. Причиной таких перестроек является реорганизация внеклеточного матрикса посредством работы матриксных металлопротеиназ (ММР), представляющих собой цинк-зависимые ферменты с широкой субстратной специфичностью. Кроме того, более чем в 70% случаев АГ сочетается с нарушениями липидного обмена, в том числе повышением уровня холестерина. Эти механизмы обязывают учитывать их при оценке факторов риска развития кардиоваскулярных катастроф. В обзорных источниках недостаточно описывается роль ММР-2 и комплексов ММР-9/ТИМР-1, ММР-2/ТИМР-2 в патогенезе реструктуризации сосудов. В статье представлены результаты исследования системы протеолитических ферментов и уровня общего холестерина у 110 практически здоровых людей и 90 людей с артериальной гипертензией в возрасте от 18 до 74 лет. Уровни ММР-2, комплексов ММР-9/ТИМР-1, ММР-2/ТИМР-2 в сыворотке крови исследовали методом сэндвич-варианта твердофазного иммуноферментного анализа. Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью аналитического программного обеспечения

Адрес для переписки:

Чепурнова Наталья Сергеевна
ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный
медицинский университет» Министерства
здравоохранения РФ
690002, Россия, г. Владивосток, пр. Острякова, 2.
Тел.: 8 (914) 960-60-06.
E-mail: dr.cns@yandex.ru

Address for correspondence:

Natalya S. Chepurnova
Pacific State Medical University
2 Ostryakov Ave
Vladivostok
690002 Russian Federation
Phone: +7 (914) 960-60-06.
E-mail: dr.cns@yandex.ru

Образец цитирования:

Н.С. Чепурнова, С.В. Кныш, В.Н. Ющук,
Е.В. Маркелова, К.Р. Санацкий, А.Н. Ющенко,
М.З. Ермолицкая «Содержание матриксной
металлопротеиназы 2-го типа (ММР-2) и
комплексов ММР-9/ТИМР-1, ММР-2/ТИМР-2
и общего холестерина у практически здоровых
людей и пациентов с артериальной гипертензией»
// Российский иммунологический журнал, 2023. Т. 26,
№ 4. С. 567-572.
doi: 10.46235/1028-7221-13546-COM
© Чепурнова Н.С. и соавт., 2023
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

N.S. Chepurnova, S.V. Knysh, V.N. Yushchuk,
E.V. Markelova, K.R. Sanatsky, A.N. Yushchenko,
M.Z. Yermolitskaya "Contents of matrix metalloproteinase
type 2 (MMP-2) and complexes MMP-9/TIMP-1,
MMP-2/TIMP-2, and total cholesterol in practically healthy
people and patients with hypertension", Russian Journal
of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2023,
Vol. 26, no. 4, pp. 567-572.
doi: 10.46235/1028-7221-13546-COM
© Chepurnova N.S. et al., 2023
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.46235/1028-7221-13546-COM

IBM SPSS Statistics, v. 22.0.1. Выявлено, что в группах женщин, независимо от наличия или отсутствия патологии уровень общего холестерина выше в сравнении с мужской группой обследуемых. Значения MMP-2 были низкими как в общей группе практически здоровых людей независимо от пола, так и в группе мужчин с АГ. Протеолитическая активность MMP-2 в большей степени проявляет свою широкую субстратную активность в группе женщин с АГ. В группе практически здоровых мужчин и женщин зафиксированы более низкие уровни исследуемых комплексов матриксных металлопротеиназ и их тканевых ингибиторов. Дисбаланс в системе протеолиз/антипротеолиз наблюдается как в группе женщин с АГ, где более выражено влияние на миграцию, пролиферацию и апоптоз гладкомышечных, эндотелиальных и воспалительных клеток, определяющих формирование интимы и артериальное ремоделирование, так и в группе мужчин с АГ, где превалирует ремоделирующий фактор, влияющий на ригидность стенки сосудов.

Ключевые слова: матриксные металлопротеиназы, возраст, практически здоровые женщины, система протеолиза, холестерин, артериальная гипертензия

CONTENTS OF MATRIX METALLOPROTEINASE TYPE 2 (MMP-2) AND COMPLEXES MMP-9/TIMP-1, MMP-2/TIMP-2, AND TOTAL CHOLESTEROL IN PRACTICALLY HEALTHY PEOPLE AND PATIENTS WITH HYPERTENSION

Chepurnova N.S.^a, Knysh S.V.^a, Yushchuk V.N.^a, Markelova E.V.^a, Sanatsky K.R.^a, Yushchenko A.N.^a, Yermolitskaya M.Z.^b

^a Pacific State Medical University, Vladivostok, Russian Federation

^b Institute of Automation and Control Processes, Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences, Vladivostok, Russian Federation

Abstract. Arterial hypertension (AH) is the most common age-associated disease among the working population. Polyetiology of AH requires a more thorough definition and study of its predictors aiming for understanding the role of external influences, as well as detection of genetic polymorphisms at early stages, in order to limit their implementation. The scientific reviews discuss the important role of abnormal vascular remodeling in the pathogenesis of hypertension. The main factor of such alterations is the rearrangement of extracellular matrix due to matrix metalloproteinases (MMP), the zinc-dependent enzymes with a wide substrate specificity. In addition, in more than 70% of cases, AH is combined with lipid metabolism disorders, including an increase in cholesterol levels. These mechanisms should be taken into account when assessing risk factors for development of cardiovascular accidents. The role of MMP-2 and the complexes MMP-9/TIMP-1, MMP-2/TIMP-2 in pathogenesis of vascular restructuring is insufficiently described in the review articles. The article presents our results of studying the system of proteolytic enzymes and the level of total cholesterol in 110 practically healthy people and 90 persons with AH aged 18 to 74 years old. The levels of MMP-2, MMP-9/TIMP-1, MMP-2/TIMP-2 complexes in blood serum were studied by the sandwich variant of ELISA technique. Statistical processing of the obtained data was carried out using the analytical software IBM SPSS Statistics, v. 22.0.1. It was found that in the groups of women, regardless of the presence, or absence of pathology, the level of total cholesterol is higher if compared with male subjects. MMP-2 values were low both in the general group of practically healthy people, regardless of gender, and in the group of men with hypertension. Proteolytic activity of MMP-2 shows a broader substrate activity in women with hypertension. In the group of practically healthy men and women, we have registered lower levels of the studied MMP complexes and their tissue inhibitors. An imbalance in the proteolysis/antiproteolysis system is observed both in the group of hypertensive women with more pronounced effects upon migration, proliferation and apoptosis of smooth muscle cells, endothelial and inflammatory cells, thus determining formation of intima and arterial remodeling, as well as in the group of men with hypertension with predominance of remodeling factors that affects the rigidity of vascular wall.

Keywords: matrix metalloproteinases, age, practically healthy women, proteolysis system, cholesterol, arterial hypertension

Введение

Научным сообществом признается важнейшая роль сосудистой дисфункции и ремоделирования сосудов в развитии артериальной гипертензии. Зафиксированы доказательства критической роли повышения экспрессии и активности ММР в сосудах, что приводит к аномальной деградации компонентов внеклеточного матрикса, рецепторов, пептидов и внутриклеточных белков, участвующих в регуляции функции и структуры сосудов [1, 6, 7]. Несбалансированная активность ММР в сосудах способствует их сужению и ухудшает вазодилатацию, стимулируя клетки гладкой мускулатуры сосудов переключаться с сократительного на синтетический фенотип, тем самым облегчая рост и/или миграцию клеток, что сопряжено с нарушением структуры внеклеточного матрикса [4, 7]. В литературе представлены лишь отдельные работы, касающиеся взаимосвязи маркеров АГ и выраженности процессов ремоделирования, а исследования, посвященные оценке вышеуказанных показателей у практически здоровых людей, единичны.

Цель исследования – провести сравнительный анализ некоторых компонентов системы металлопротеиназ и уровня общего холестерина у практически здоровых людей и людей с артериальной гипертензией.

Материалы и методы

Материалом для исследования послужила сыворотка крови 110 практически здоровых женщин и мужчин, а также 90 женщин и мужчин с артериальной гипертензией. Уровни ММР-2, комплексов ММР-9/ТИМР-1, ММР-2/ТИМР-2 и общего холестерина в сыворотке крови исследовали методом сэндвич-варианта твердофазного иммуноферментного анализа, учет результатов производили с помощью иммуноферментного анализатора Multiscan (Финляндия). Расчет количества ММР-2, комплексов ММР-9/ТИМР-1, ММР-2/ТИМР-2 и общего холестерина проводили путем построения калибровочной кривой с помощью компьютерной программы, результаты представили в нг/мл и ммоль/л соответственно. Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью аналитического программного обеспечения IBM SPSS Statistics, 22.0. Для выявления взаимосвязи между переменными был использован коэффициент корреляции рангов Спирмена.

Результаты и обсуждение

При исследовании уровня общего холесте-рина в группе практически здоровых женщин

и женщин с АГ выявлены более высокие значения в сравнении с показателями группы практически здоровых мужчин ($p < 0,05$, табл. 1). Плехова Н.Г. и соавт. (2019) значимых различий в уровне общего холестерина (ОХ) между обследуемыми лицами с нормальным давлением и лицами с наличием АГ не обнаружили [5]. Уровень ММР-2 также был выше в группах женщин, однако самые высокие показатели зафиксированы в группе женщин с АГ, в то время как в обеих исследуемых группах мужчин значения ММР-2 между собой достоверно не отличались. Похожая тенденция была отмечена при определении комплекса ММР-9/ТИМР-1: в группах женщин без патологии и с АГ отмечены более высокие значения, между группами достоверных различий не выявлено. Значения комплекса ММР-9/ТИМР-1 у мужчин были достоверно ниже ($p < 0,05$). Деградация и реорганизация внеклеточного матрикса сосудистой стенки осуществляются под влиянием в том числе ММР типа 9, в избытке представленной в артериальной сосудистой сети. Литвинова М.С. и соавт. (2022) при изучении активности ММР у лиц с АГ зафиксировали повышение уровня ММР-9 в группах с контролируемой и неконтролируемой резистентной АГ. Это может приводить к компенсаторной активации ТИМР-1 [2]. В некоторых исследованиях сообщалось, что повышенное содержание ТИМР-1 было ассоциировано с повышенной частотой гипертензии и риском прогрессирования АГ [8]. Литвинова М.С. и соавт. (2022) выявили у лиц с неконтролируемой резистентной АГ более выраженное повышение ТИМР-1 и соотношения ТИМР-1/ММР-9 [2]. Исследователи объяснили это тем, что синтез и высвобождение ММР-9 в большей степени связаны с уровнем артериального давления, а образование ТИМР-1 регулируется более сложным сочетанием нейрогормональных факторов и связано с большей напряженностью профибротических процессов. Неоднозначные результаты были получены при исследовании значений комплекса ММР-2/ТИМР-2: самые высокие уровни зафиксированы в группе женщин с АГ, а самые низкие в группе мужчин с АГ. Михин В.П. и соавт. (2022) продемонстрировали высокие уровни (в отличие от здоровых людей) ММР-1 и ММР-9 и низкие значения ТИМР-1 и ТИМР-4 в крови больных АГ с высоким сердечно-сосудистым риском [3]. Были выявлены корреляционные закономерности в исследуемых группах. В группе практически здоровых женщин обнаружены значимые отрицательные корреляции между комплексом ММР-9/ТИМР-1 и ММР-2 ($r = -0,618$), прямые корреляции между комплексами ММР-9/ТИМР-1 и ММР-2/ТИМР-2 ($r = 0,440$). В группе практически здоровых муж-

ТАБЛИЦА 1. ЗНАЧЕНИЯ MMP-2, КОМПЛЕКСОВ MMP-9/TIMP-1 И MMP-2/TIMP-2, А ТАКЖЕ УРОВНЯ ОБЩЕГО ХОЛЕСТЕРИНА У ОБСЛЕДУЕМЫХ МУЖЧИН И ЖЕНЩИН, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 1. VALUES OF MMP-2, MMP-9/TIMP-1 AND MMP-2/TIMP-2 COMPLEXES, AS WELL AS THE LEVEL OF TOTAL CHOLESTEROL IN THE MEN AND WOMEN EXAMINED, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

№ No.	Показатели Indicators	Практически здоровые женщины Practically healthy women n = 60	Женщины с АГ Women with AH n = 50	Практически здоровые мужчины Practically healthy women n = 50	Мужчины с АГ Women with AH n = 40
1	Общий холестерин, ммоль/л Total cholesterol, mmol/L	5,27 (4,51-6,20) p ₁₋₃ < 0,05	5,38 (4,38-6,26) p ₂₋₃ < 0,05	4,35 (3,70-4,67)	5,0 (4,20-5,78)
2	MMP-2, нг/мл MMP-2, ng/mL	93,3 (74,30-103,23) p ₁₋₂ < 0,05	111,28 (91,53-127,54) p ₂₋₃ < 0,001 p ₂₋₄ < 0,001	76,8 (69,95-82,11) p ₁₋₃ < 0,01	78,12 (73,17-85,34) p ₁₋₄ < 0,01
3	MMP-9/TIMP-1, нг/мл MMP-9/TIMP-1, ng/mL	8,82 (6,21-9,05) p ₁₋₃ < 0,05 p ₁₋₄ < 0,05	8,94 (6,71-9,12) p ₂₋₃ < 0,05 p ₂₋₄ < 0,05	7,65 (6,61-9,23)	6,53 (6,01-7,28)
4	MMP-2/TIMP-2, нг/мл MMP-2/TIMP-2, ng/mL	51,5 (8,48-112,14) p ₁₋₂ < 0,01 p ₁₋₄ < 0,01	70,89 (11,25-145,23) p ₂₋₃ < 0,01 p ₂₋₄ < 0,001	45,08 (7,93-65,89)	25,64 (14,42-43,18)

чин обнаружена прямая связь между комплексами MMP-9/TIMP-1 и MMP-2/TIMP-2 ($r = 0,59$), MMP-2 и уровнем общего холестерина ($r = 0,345$). В группе женщин с АГ установлена отрицательная связь средней силы между уровнями комплекса MMP-9/TIMP-1 и MMP-2 ($r = -0,66$). В группе мужчин с АГ выявлена прямая корреляция между уровнем общего холестерина и MMP-2 ($r = 0,42$) и отрицательная корреляционная связь средней силы между комплексом MMP-9/TIMP-1 и MMP-2 ($r = -0,55$), а также между MMP-2 и комплексом MMP-9/TIMP-1 ($r = -0,544$).

Таким образом, дисбаланс в системе протеолиз/антипротеолиз наблюдается как в группе женщин с АГ, где более выражено влияние на миграцию, пролиферацию и апоптоз гладкомышечных, эндотелиальных и воспалительных клеток,

определяющих формирование интимы и артериальное ремоделирование, так и в группе мужчин с АГ, где превалирует ремоделирующий фактор, влияющий на ригидность стенки сосудов.

Выводы

1. В группе практически здоровых мужчин и женщин зафиксированы более низкие уровни исследуемых комплексов матриксных металлопротеиназ и их тканевых ингибиторов.

2. Протеолитическая активность MMP-2 в большей степени проявляет свою широкую субстратную активность в группе женщин с АГ.

3. В группах женщин, независимо от наличия или отсутствия патологии, уровень общего холестерина выше в сравнении с мужской группой обследуемых.

Список литературы / References

1. Грачев Н.И., Красников В.Е., Турмова Е.П., Маркелова Е.В., Рублев В.Ю., Назаренко С.А. Анализ показателей матриксной металлопротеиназы-9, тканевого ингибитора матриксных металлопротеиназ 1-го типа и их комплекса у пациентов с острым инфарктом миокарда, подвергшихся чрескожным коронарным вмешательствам // Тихоокеанский медицинский журнал, 2018. № 4 (74). С. 45-48. [Grachev N.I., Krasnikov V.E., Turmova E.P., Markelova E.V., Rublev V.Yu., Nazarenko S.A. Analysis of matrix metalloproteinase-9, type 1 inhibitor of matrix metalloproteinase and their complex in patients with acute myocardial infarction who have exposed high coronary interventions. *Tikhookeanskiy meditsinskiy zhurnal = Pacific Medical Journal*, 2018, no. 4 (74), pp. 45-48. (In Russ.)]

2. Литвинова М.С., Хаишева Л.А., Шлык С.В., Абоян И.А. Активность матричной металлопротеиназы типа 9 и её связь с выраженностью кальцификации грудной аорты у пациентов с резистентной артериальной гипертензией: одномоментное сравнительное исследование // CardioСоматика, 2022. Т. 13, № 3. С. 148-155. [Litvinova M.S., Khaisheva L.A., Shlyk S.V., Aboyan I.A. The activity of matrix metalloproteinase type 9 and its relationship with the severity of calcification of the thoracic aorta in patients with resistant hypertension: a one-stage comparative study. *CardioSomatika = CardioSomatics*, 2022, Vol. 13, no. 3, pp. 148-155. (In Russ.)]
3. Михин В.П., Осипова О.А., Воротынцева В.В., Перуцкий Д.Н., Головина Н.И. Содержание матричных металлопротеиназ в крови больных артериальной гипертензией с высоким сердечно-сосудистым риском на фоне терапии статинами // Кардиоваскулярная терапия и профилактика, 2022. Т. 21, № 10, 3422. [Mikhin V.P., Osipova O.A., Vorotyntseva V.V., Perutsky D.N., Golovina N.I. The content of matrix metalloproteinases in the blood of patients with arterial hypertension with high cardiovascular risk on the background of statin therapy. *Kardiovaskulyarnaya terapiya i profilaktika = Cardiovascular Therapy and Prevention*, 2022, Vol. 21, no. 10, 3422. (In Russ.)] doi: 10.15829/1728-8800-2022-3422.
4. Москаленко М.И. Вовлеченность генов матричных металлопротеиназ в развитии артериальной гипертензии и ее осложнений // Научные результаты биомедицинских исследований, 2018. Т. 4, № 1. С. 53-59. [Moskalenko M.I. The involvement of genes of matrix metalloproteinases in the development of arterial hypertension and its complication (review). *Nauchnye rezultaty biomeditsinskikh issledovaniy = Research Result. Medicine and Pharmacy*, 2018, Vol. 4, no. 1, pp. 53-69. (In Russ.)]
5. Плехова Н.Г., Невзорова В.А., Родионова Л.В., Лагурева А.В., Масленникова К.К., Цыганков М.А., Дубов В.С. Показатели липопротеинового метаболизма у пациентов молодого возраста с артериальной гипертензией // Вестник современной клинической медицины, 2019. Т. 12, вып. 4. С. 44-51. [Plekhnova N.G., Nevzorova V.A., Rodionova L.V., Lagureva A.V., Maslennikova K.K., Tsygankov M.A., Dubov V.S. Indications of lipoprotein metabolism in young patients with arterial hypertension. *Vestnik sovremennoy klinicheskoy meditsiny = Bulletin of Modern Clinical Medicine*, 2019, Vol. 12, Iss. 4, pp. 44-51. (In Russ.)]
6. Chang C.-H., Yeh S.-T., Ooi S.-W., Li C.-Y., Chen H.-F. The relationship of low-density lipoprotein cholesterol and all-cause or cardiovascular mortality in patients with type 2 diabetes: a retrospective study. *PeerJ*, 2023, Vol. 11, e14609. doi: 10.7717/peerj.14609.
7. Prado A.F., Batista R.I.M., Tanus-Santos J.E., Gerlach R.F. Matrix Metalloproteinases and arterial hypertension: role of oxidative stress and nitric oxide in vascular functional and structural alterations. *Biomolecules*, 2021, Vol. 11, no. 4, 585. doi: 10.3390/biom11040585.
8. Valente F.M., de Andrade D.O., Cosenso-Martin L.N., Cesarino C.B., Guimarães S.M., Guimarães V.B., Lacchini R., Tanus-Santos J.E., Yugar-Toledo J.C., Vilela-Martin J.F. Plasma levels of matrix metalloproteinase-9 are elevated in individuals with hypertensive crisis. *BMC Cardiovasc Disord.*, 2020, Vol. 20, no. 1, 132. doi: 10.1186/s12872-020-01412-5.

Авторы:

Чепурнова Н.С. — к.м.н., доцент кафедры нормальной и патологической физиологии ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Владивосток, Россия

Кныш С.В. — к.м.н., доцент кафедры нормальной и патологической физиологии ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Владивосток, Россия

Ющук В.Н. — ассистент кафедры общественного здоровья и здравоохранения ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Владивосток, Россия

Authors:

Chepurnova N.S., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Normal and Pathological Physiology, Pacific State Medical University, Vladivostok, Russian Federation

Knysh S.V., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Normal and Pathological Physiology, Pacific State Medical University, Vladivostok, Russian Federation

Yushchuk V.N., Assistant Professor, Department of Public Health and Public Health, Pacific State Medical University, Vladivostok, Russian Federation

Маркелова Е.В. — д.м.н., профессор, заведующая кафедрой нормальной и патологической физиологии ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Владивосток, Россия

Markelova E.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Normal and Pathological Physiology, Pacific State Medical University, Vladivostok, Russian Federation

Санацкий К.Р. — студент лечебного факультета ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Владивосток, Россия

Sanatsky K.R., Student, Medical Faculty, Pacific State Medical University, Vladivostok, Russian Federation

Ющенко А.Н. — студентка лечебного факультета ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Владивосток, Россия

Yushchenko A.N., Student, Medical Faculty, Pacific State Medical University, Vladivostok, Russian Federation

Ермолицкая М.З. — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории информационно-аналитических и управляющих систем и технологий ФГБУН «Институт автоматизации и процессов управления» Дальневосточного отделения Российской академии наук, г. Владивосток, Россия

Yermolitskaya M.Z., PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Information-Analytical and Control Systems and Technologies, Institute of Automation and Control Processes, Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences, Vladivostok, Russian Federation

Поступила 07.07.2023
Принята к печати 12.07.2023

Received 07.07.2023
Accepted 12.07.2023

ДИНАМИКА УРОВНЯ ТРАНСФОРМИРУЮЩИХ ФАКТОРОВ РОСТА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ПРИ ОСТРОМ ПОЧЕЧНОМ ПОВРЕЖДЕНИИ У ПАЦИЕНТОВ ПОСЛЕ АОРТОКОРОНАРНОГО ШУНТИРОВАНИЯ

Маркелова Е.В.¹, Фисенко В.Г.², Зенина А.А.², Силаев А.А.²,
Ермолицкая М.З.³, Шуматов В.Б.¹

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

² ФГАОУ ВО «Дальневосточный федеральный университет», г. Владивосток, Россия

³ ФГБУН «Институт автоматики и процессов управления» Дальневосточного отделения Российской
академии наук, г. Владивосток, Россия

Резюме. Острое повреждение почек одно из опасных и распространенных осложнений после открытых кардиохирургических операций. В связи с этим активно ведется поиск биологических маркеров, которые позволят своевременно выявлять это осложнение. В статье представлена динамика TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3 в сыворотке крови до и после аортокоронарного шунтирования. В исследовании участвовали 120 пациентов с многососудистым поражением коронарного русла и 50 относительно здоровых людей того же возраста. В I группу вошло 50 пациентов, у которых после операции не отмечалось признаков острого почечного повреждения, во II группу вошли 70 пациентов с острым почечным повреждением. Исследование в сыворотке крови TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3 осуществлялось методом твердофазного иммуноферментного анализа в основных группах до операции (1), сразу после операции (2), на 2-е сутки после операции (3), на 7-е сутки после операции (4), а в группе контроля — однократно. Результаты выражались в виде медианы, верхнего и нижнего квартиля в нг/мл или пг/мл. Уровень значимости определялся с помощью критерия Вилкоксона. Выявлены динамические изменения представителей семейства TGF- β в сыворотке крови пациентов до и после АКШ. Исходно до операции в обеих основных группах определено нормальное содержание TGF- β 1, низкий уровень TGF- β 3, тогда как повышение TGF- β 2 выявлено только в группе с последующим развитием острого почечного повреждения. В динамике наблюдения TGF- β 1 снижался в период после операции и на 2-й день после нее, повышаясь выше исходного уровня на 7-е сутки, не отмечалось значимых различий в группах с и без осложнений. Не выявлено динамических различий TGF- β 2 у пациентов I груп-

Адрес для переписки:

Зенина Александра Александровна
ФГАОУ ВО «Дальневосточный федеральный университет»
690105, Россия, г. Владивосток,
ул. Невельского, 1, кв. 208.
Тел.: 8 (914) 707-26-52.
E-mail: Aleksandra-z@list.ru

Address for correspondence:

Aleksandra A. Zenina
Pacific State Medical University
1 Nevelsky St, Apt 208
Vladivostok
690105 Russian Federation
Phone: +7 (914) 707-26-52.
E-mail: Aleksandra-z@list.ru

Образец цитирования:

Е.В. Маркелова, В.Г. Фисенко, А.А. Зенина,
А.А. Силаев, М.З. Ермолицкая, В.Б. Шуматов
«Динамика уровня трансформирующих факторов
роста в сыворотке крови при остром почечном
повреждении у пациентов после аортокоронарного
шунтирования» // Российский иммунологический
журнал, 2023, Т. 26, № 4. С. 573-578.
doi: 10.46235/1028-7221-13544-DOT

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

For citation:

E.V. Markelova, V.G. Fisenko, A.A. Zenina, A.A. Silaev,
M.Z. Yermolitskaya, V.B. Shumatov "Dynamics of the level
of transforming growth factors in blood serum in acute kidney
injury in patients after coronary artery bypass grafting",
Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii
Zhurnal, 2023, Vol. 26, no. 4, pp. 573-578.
doi: 10.46235/1028-7221-13544-DOT

© Markelova E.V. et al., 2023
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.46235/1028-7221-13544-DOT

пы после операции. Тогда как во II группе после АКШ значения TGF- β 2 были выше по сравнению с контролем на протяжении всего мониторинга, но выше уровня в I группе были только на 2-й день после операции. Уровень TGF- β 3 повышался сразу после операции в обеих группах, с последующим снижением в I группе. Во II группе после АКШ исходный дефицит TGF- β 3, волнообразно изменяясь во 2-й и 3-й период мониторинга, на 7-й день повышался и стал выше, чем в I группе, но не достигал референсных значений. Дальнейшие исследования в группе с ОПП после АКШ, в зависимости о тяжести и исходов, позволят выявить новые закономерности и особенности изменений системы TGF- β у пациентов с этой патологией.

Ключевые слова: острое почечное повреждение, TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, аортокоронарное шунтирование, ишемическая болезнь сердца

DYNAMICS OF THE LEVEL OF TRANSFORMING GROWTH FACTORS IN BLOOD SERUM IN ACUTE KIDNEY INJURY IN PATIENTS AFTER CORONARY ARTERY BYPASS GRAFTING

Markelova E.V.^a, Fisenko V.G.^b, Zenina A.A.^b, Silaev A.A.^b,
Yermolitskaya M.Z.^c, Shumatov V.B.^a

^a Pacific State Medical University, Vladivostok, Russian Federation

^b Far Eastern Federal University, Vladivostok, Russian Federation

^c Institute of Automation and Control Processes, Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences, Vladivostok, Russian Federation

Abstract. Acute kidney injury (AKI) is among most dangerous and common complications after open-heart cardiocirculatory operations. Therefore, a search is carried out for biological markers which could timely detect this condition. The article presents dynamics of TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3 in blood serum prior and after a coronary artery bypass (CAB). The study included 120 patients with multivascular affection of coronary blood flow, and 50 conventionally healthy persons of similar age. The 1st group included 50 patients without evidence of AKI, the 2nd group consisted of 70 patients with AKI. Serum TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3 was determined by ELISA technique in the main groups before (1) and after surgery (2) as well as on day 2 after operation (3), on day 7 after surgery (4), and once tested in the control group. The results were expressed in ng/mL or pg/mL, as median values, upper and lower quartiles. Significance levels were determined by the Wilcoxon criterion. We have revealed dynamic changes of TGF- β levels in serum of the patients before and after CAB. Initially, before operation, we have found normal TGF- β 1 levels and low TGF- β 3 levels in the both main groups. Meanwhile, increased TGF- β 2 levels are found only in the subgroup with subsequent AKI development. The dynamics of TGF- β 1 showed a decrease just after surgery and 2 days later, being increased over initial level on day 7, and there were no significant differences for the groups with versus without complications. No dynamic differences were revealed for TGF- β 2 in the patients of group 1 after surgery. Meanwhile, the group 2 after CAB displayed higher TGF- β 2 values compared with controls during the entire follow-up period, being, however, higher than in the group on the 2nd day following surgery. The TGF- β 3 levels were increased just after surgery in both groups followed by subsequent decrease in group 1. In the 2nd group after CAB, the initial deficiency of TGF- β 3 was changes in wave-like mode, over 2nd and 3rd period of monitoring. It was increased on day 7, becoming higher than in group 1 but did not reach reference values. Further studies in the AKI group after CAB which depend on their severity and outcomes may detect new features of TGF- β system in the patients with this disorder.

Keywords: acute kidney injury, TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, coronary artery bypass grafting, ischemic heart disease

Введение

Острое повреждение почек (ОПП) — одно из опасных и распространенных осложнений после открытых кардиохирургических операций. Часто оно имеет субклинический характер течения, который трудно и несвоевременно диагностируется

и является причиной ухудшения исходов вмешательств [1]. В связи с этим активно ведется поиск биологических маркеров ОПП, которые позволяют своевременно выявлять это осложнение. В нашей статье мы рассмотрим динамику трансформирующих факторов роста TGF- β 1, TGF- β 2,

TGF-β3 в сыворотке крови до и после аортокоронарного шунтирования (АКШ).

Материалы и методы

В исследовании участвовали 120 пациентов пожилого возраста с ишемической болезнью сердца и многососудистым поражением коронарного русла и 50 относительно здоровых человек того же возраста. В I группу вошло 50 пациентов, у которых после операции не отмечалось признаков ОПП, во II группу вошли 70 пациентов с ОПП. Исследование в сыворотке крови TGF-β1, TGF-β2, TGF-β3 осуществлялось методом твердофазного иммуноферментного анализа в основных группах до операции (1), сразу после операции (2), на 2-е сутки после операции (3), на 7-е сутки после операции (4), а в группе контроля – однократно. Результаты выражались в виде медианы, верхнего и нижнего квартиля в нг/мл или пг/мл. Уровень значимости определялся с помощью критерия Уилкоксона.

Результаты и обсуждение

Содержание TGF-β1 в сыворотке крови у пациентов с ОПП до операции существенно не отличалось от пациентов без ОПП на этом этапе исследования и людей из контрольной группы 25,48 (23,39-31,59) нг/мл ($p = 0,6742$). В период после операции уровень этого трансформирующего фактора роста в основных группах значимо снижался и стал отличаться от референсных цифр. На 2-е сутки после операции значение TGF-β1 не

изменялось и существенно не отличалось между группами. На 7-е сутки после операции установлено повышение этого показателя и в I группе, и II группе, но существенной разницы между этими группами не выявлено ($p = 0,1199$). При этом зафиксировано отличие между пациентами без ОПП с контрольной группой $p_{4, III} = 0,0376$. Учитывая сходную динамику изменений и отсутствие разницы между группами без и с ОПП, возможно, что изменения в этих группах (по сравнению с референсными значениями) после операции и на 7-е сутки после операции больше связаны с системным воспалением после АКШ, чем с возникновением почечных осложнений, что согласуется с рядом исследований [3, 4] (табл. 1, 2).

Уровень TGF-β2 в сыворотке крови в начале исследования во II группе был выше, чем в контрольной группе (74,84 (65,98-125,59) пг/мл), $p_{1, III} = 0,00639$, но не имел значимых различий с пациентами I группы $p_{1, II} = 0,3091$. Тогда как разницы между I группой и контрольной не выявлено. В дальнейшем после операции определено значимое снижение этого показателя только у пациентов с ОПП $p_{1,2} = 0,01454$, но оно все же осталось выше, чем референсные значения $p_{2, III} = 0,03371$. На 2-е сутки после операции TGF-β2 значимо не изменялся в группах, однако его уровень во II группе оказался выше, чем в I и III группах. На 7-е сутки после операции существенной динамики этого показателя не происходило, но статистической разницы между I и II группами уже не регистрировалось, $p_{1, II} = 0,4047$ (табл. 1, 2). Следует отметить, что, хотя разница между пациентами

ТАБЛИЦА 1. УРОВЕНЬ TGF В СЫВОРОТКЕ КРОВИ У ПАЦИЕНТОВ БЕЗ ОПП ДО И ПОСЛЕ АКШ

TABLE 1. SERUM TGF LEVELS IN PATIENTS WITHOUT AKI BEFORE AND AFTER CABG

Период исследования Study period	TGF-β1, нг/мл TGF-β1, ng/mL	TGF-β2, пг/мл TGF-β2, pg/mL	TGF-β3, пг/мл TGF-β3, pg/mL
До операции Before surgery (1)	30,1 (25,53-33,19) $p_{1, III} = 0,6742$	95,68 (28,08-144,40) $p_{1, III} = 0,2995$	23,26 (11,69-33,07) $p_{1, III} = 1,015e-08$
После операции After operation (2)	21,72 (9,86-31,26) $p_{1,2} = 0,0001$ $p_{2, III} = 0,0389$	78,79 (20,48-131,70) $p_{1,2} = 0,96$ $p_{2, III} = 0,3236$	44,52 (19,52-68,35) $p_{1,2} = 0,001044$ $p_{2, III} = 0,0002151$
На 2-е сутки после операции 2 days after surgery (3)	23,08 (7,31-32,70) $p_{1,3} = 0,01229$ $p_{2,3} = 0,7394$ $p_{3, III} = 0,09716$	79,58 (21,48-147,60) $p_{1,3} = 0,1186$ $p_{2,3} = 0,6653$ $p_{3, III} = 0,1931$	30,31 (13,94-40,40) $p_{1,3} = 0,1227$ $p_{2,3} = 0,07957$ $p_{3, III} = 1,419e-07$
На 7-е сутки после операции 7 days after surgery (4)	36,5 (28,36-45,61) $p_{1,4} = 0,002456$ $p_{2,4} = 2,264e-7$ $p_{3,4} = 2,098e-5$ $p_{4, III} = 0,0376$	97,72 (24,33-131,30) $p_{1,4} = 0,2568$ $p_{2,4} = 0,8022$ $p_{3,4} = 0,6005$ $p_{4, III} = 0,4246$	17,51 (2,33-33,43) $p_{1,4} = 0,8417$ $p_{2,4} = 0,008254$ $p_{3,4} = 0,0842$ $p_{4, III} = 7,132e-13$

Примечание. $p_{1,2,3,4, III}$ – уровень значимости, полученный при проверке различий между показателями на разных этапах исследования (1, 2, 3, 4) и группой контроля (III).

Note. $p_{1,2,3,4, III}$, significance level obtained by checking the differences between the indicators at different stages of the study (1, 2, 3, 4) and the control group (III).

ТАБЛИЦА 2. УРОВЕНЬ TGF В СЫВОРОТКЕ КРОВИ У ПАЦИЕНТОВ С ОПП ДО И ПОСЛЕ АКШ

TABLE 2. SERUM TGF LEVELS IN PATIENTS WITH AKI BEFORE AND AFTER CABG

Период исследования Study period	TGF-β1, нг/мл TGF-β1, ng/mL	TGF-β2, пг/мл TGF-β2, pg/mL	TGF-β3, пг/мл TGF-β3, pg/mL
До операции Before surgery (1)	30,72 (17,30-38,49) $p_{1,III} = 0,9854$ $p_{I,II} = 0,9106$	133,1 (74,46-147,60) $p_{1,III} = 0,00639$ $p_{I,II} = 0,3091$	13,27 (2,03-36,05) $p_{1,III} = 8,389e-10$ $p_{I,II} = 0,2494$
После операции After operation (2)	22,38 (14,08-29,54) $p_{1,2} = 0,0214$ $p_{2,III} = 0,04938$ $p_{I,II} = 0,6346$	104,8 (62,24-154,50) $p_{1,2} = 0,01454$ $p_{2,III} = 0,03371$ $p_{I,II} = 0,08639$	40,06 (13,06-60,07) $p_{1,2} = 0,001311$ $p_{2,III} = 0,0001329$ $p_{I,II} = 0,5957$
На 2-е сутки после операции 2 days after surgery (3)	21,17 (10,07-31,30) $p_{1,3} = 0,008643$ $p_{2,3} = 0,6983$ $p_{3,III} = 0,08739$ $p_{I,II} = 0,8021$	123,2 (54,83-170,60) $p_{1,3} = 0,1645$ $p_{2,3} = 0,5831$ $p_{3,III} = 0,00129$ $p_{I,II} = 0,01608$	22,64 (16,63-27,08) $p_{1,3} = 0,4239$ $p_{2,3} = 0,001179$ $p_{3,III} = 6,451e-10$ $p_{I,II} = 0,1585$
На 7-е сутки после операции 7 days after surgery (4)	32,39 (17,51-44,10) $p_{1,4} = 0,03792$ $p_{2,4} = 0,009643$ $p_{3,4} = 0,002042$ $p_{4,III} = 0,922$ $p_{I,II} = 0,1199$	124,6 (32,47-142,00) $p_{1,4} = 0,00131$ $p_{2,4} = 0,09083$ $p_{3,4} = 0,06299$ $p_{4,III} = 0,03045$ $p_{I,II} = 0,4047$	42,84 (17,05-69,40) $p_{1,4} = 0,0007667$ $p_{2,4} = 0,9639$ $p_{3,4} = 0,0002768$ $p_{4,III} = 1,932e-05$ $p_{I,II} = 0,0008472$

Примечание. $p_{1,2,3,4,III}$ – уровень значимости, полученный при проверке различий между показателями на разных этапах исследования (1, 2, 3, 4) и группой контроля (III); I, II – статистические различия между основными группами: I – без ОПП, II – с ОПП.

Note. $p_{1,2,3,4,III}$, the significance level obtained by checking the differences between the indicators at different stages of the study (1, 2, 3, 4) and the control group (III); I, II – statistical differences between the main groups: I, without AKI; II, with AKI.

без и с ОПП наблюдалась лишь на 2-е сутки после операции, у пациентов с ОПП на протяжении всего исследования отмечался повышенный уровень TGF-β2 по сравнению с группой контроля, в отличие от пациентов с гладким послеоперационным периодом, где его значения сопоставимы с референсными. Это, скорее всего, обусловлено наличием воспаления еще до операции и более выраженным противовоспалительным ответом на операцию у пациентов с ОПП, что подтверждается рядом исследований [3].

Содержание TGF-β3 в сыворотке крови до операции в I и II группе статистически не отличалось $p_{I,II} = 0,2494$, но было в обеих группах значимо ниже, чем в контрольной группе 80,75 (70,19-89,25) пг/мл. Следует отметить, что дефицит TGF-β3 в основных группах по сравнению с группой контроля прослеживался в течении всего исследования. В дальнейшем зарегистрирован рост TGF-β3 в основных группах, но его уровень все же оставался ниже, чем в контрольной группе. На 2-е сутки после операции значимое снижение выявлено лишь во II группе, $p_{2,3} = 0,001179$, но статистической разницы между I и II группой не было, $p_{I,II} = 0,1585$. На заключительном этапе исследования в I группе происходило незначимое снижение этого показателя $p_{3,4} = 0,0842$, тогда как во II группе, напротив, происходило существенное повышение уровня TGF-β3 $p_{3,4} = 0,0002768$,

что привело к статистически значимым различиям между этими группами $p_{I,II} = 0,0008472$ (табл. 1, 2).

TGF-β3 известен своими репаративными свойствами без формирования фиброза [2]. Обращает внимание дефицит TGF-β3 на протяжении всего исследования, что, скорее всего, обусловлено микрососудистым повреждением почек у пациентов с ИБС и снижением их способности к полному восстановлению (без формирования фиброза) [2, 5]. Следует также отметить, что хотя до операции разница между группами без и с ОПП не выявлена, все же уровень TGF-β3 у пациентов с ОПП оказался значимо ниже, чем в группе контроля, что свидетельствует о более низкой репаративной способности у этой категории пациентов. Однако на 7-е сутки после операции у пациентов с ОПП наблюдается рост этого фактора по сравнению с пациентами без почечных осложнений, но все же его уровень остался ниже референсных значений. Это свидетельствует о включении защитно-приспособительных механизмов и связано с более выраженным воспалительным ответом в этой группе пациентов.

Заключение

Таким образом, выявлены динамические изменения представителей семейства TGF-β в сы-

воротке крови пациентов до и после АКШ. Исходно до операции в обеих основных группах определено нормальное содержание TGF-β1, низкий уровень TGF-β3, тогда как повышение TGF-β2 выявлено только в группе с последующим развитием ОПП.

В динамике наблюдения TGF-β1 снижался в период после операции и на 2-й день после нее, повышаясь выше исходного уровня на 7-е сутки, не выявлено значимых различий в группах с и без ОПП.

Не выявлено динамических различий TGF-β2 у пациентов без ОПП после операции. Тогда как в группе с ОПП после АКШ значения TGF-β2 были выше по сравнению с контролем на про-

тяжении всего мониторинга, но выше уровня в I группе были только на 2-й день после операции.

Уровень TGF-β3 повышался сразу после операции в обеих группах, с последующим снижением в I группе (без ОПП). Во II группе (с ОПП) после АКШ исходный дефицит TGF-β3, волнообразно изменяясь во второй и третий период мониторинга, на 7-й день повышался и стал выше, чем в I группе, но не достигал референсных значений.

Дальнейшие исследования в группе с ОПП после АКШ в зависимости о тяжести и исходов позволят выявить новые закономерности и особенности изменений системы TGF-β у пациентов с этой патологией.

Список литературы / References

1. Каменщиков Н.О., Подоксенов Ю.К., Дьякова М.Л., Бойко А.М., Козлов Б.Н. Острое повреждение почек в кардиохирургии: определение, эпидемиология, исходы и социально-экономическая значимость // Патология кровообращения и кардиохирургия, 2020. Т. 24, № 4. С. 11-21. [Kamenshchikov N.O., Podoksenov Yu.K., Dyakova M.L., Boyko A.M., Kozlov B.N. Acute kidney injury in cardiac surgery: definition, epidemiology, outcomes and socio-economic significance. *Patologiya krovoobrashcheniya i kardiokhirurgiya = Pathology of Blood Circulation and Cardiac Surgery*, 2020, Vol. 24, no. 4, pp. 11-21. (In Russ.)]
2. Левицкая Е.С. Механизмы формирования фиброза почек с учетом микрососудистого поражения // Медицинский вестник Юга России, 2017. Т. 8, № 1. С. 21-27. [Levitskaya E.S. Mechanisms of formation of kidney fibrosis, taking into account microvascular lesions. *Meditinskiy vestnik Yuga Rossii = Medical Bulletin of the South of Russia*, 2017, Vol. 8, no. 1, pp. 21-27. (In Russ.)]
3. Москалёв А.В., Рудой А.С., Апчел А.В., Зуева В.О., Казымова О.Э. Особенности биологии трансформирующего ростового фактора β и иммунопатология // Вестник Российской военной-медицинской академии, 2016. № 2(54). С. 206-212. [Moskalev A.V., Rudoy A.S., Apchel A.V., Zueva V.O., Kazymova O.E. Features of the biology of the transforming growth factor β and immunopathology. *Vestnik Rossiyskoy voenno-meditsinskoy akademii = Bulletin of the Russian Military Medical Academy*, 2016, no. 2 (54), pp. 206-212. (In Russ.)]
4. Bertoli-Avella A.M., Gillis E., Morisaki H., Verhagen J.M.A., de Graaf B.M., van de Beek G., Gallo E., Kruithof B.P.T., Venselaar H., Myers L.A., Laga S., Doyle A.J., Oswald G., van Cappellen G.W.A., Yamanaka I., van der Helm R.M., Beverloo B., de Klein A., Pardo L., Lammens M., Evers C., Devriendt K., Dumoulein M., Timmermans J., Bruggenwirth H.T., Verheijen F., Rodrigus I., Baynam G., Kempers M., Saenen J., van Craenenbroeck E.M., Minatoya K., Matsukawa R., Tsukube T., Kubo N., Hofstra R., Goumans M.J., Bekkers J.A., Roos-Hesselink, van de Laer I.M., Dietz B.H., van Laer L., Morisaki T., Wessels M.W., Loeys B.L. Mutations in a TGF-beta ligand, TGFβ3, cause syndromic aortic aneurysms and dissections. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 2015, Vol. 65, no. 13, pp. 1324-1336.
5. Tsuchida Y., Sumitomo S., Ishigaki K., Suzuki A., Kochi Y., Tsuchiya H., Ota M., Komai T., Inoue M., Morita K., Okamura T., Yamamoto K., Fujio K. TGF-β3 Inhibits Antibody Production by Human B Cells. *PLoS One*, 2017, Vol. 12, no. 1, e0169646. doi: 10.1371/journal.pone.0169646.

Авторы:

Маркелова Е.В. — д.м.н., профессор, заведующая кафедрой нормальной и патологической физиологии ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Владивосток, Россия

Фисенко В.Г. — врач — анестезиолог-реаниматолог ОАРИТ ФГАОУ ВО «Дальневосточный федеральный университет», г. Владивосток, Россия

Зенина А.А. — врач — анестезиолог-реаниматолог ОАРИТ ФГАОУ ВО «Дальневосточный федеральный университет», г. Владивосток, Россия

Authors:

Markelova E.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of normal and pathological physiology, Pacific State Medical University, Vladivostok, Russian Federation

Fisenko V.G., Physician, Department of Anesthesiology and Intensive Care, Far Eastern Federal University, Vladivostok, Russian Federation

Zenina A.A., Physician, Department of Anesthesiology and Intensive Care, Far Eastern Federal University, Vladivostok, Russian Federation

Силаев А.А. — к.м.н., заведующий отделением
ОАРИТ ФГАОУ ВО «Дальневосточный федеральный
университет», г. Владивосток, Россия

Ермолицкая М.З. — к.б.н., доцент ФГБУН «Институт
автоматики и процессов управления» Дальневосточного
отделения Российской академии наук, г. Владивосток,
Россия

Шуматов В.Б. — д.м.н., профессор, член-корр.
РАН, заведующий кафедрой анестезиологии
и реаниматологии ФГБОУ ВО «Тихоокеанский
государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения РФ, г. Владивосток,
Россия

Silaev A.A., PhD (Medicine), Head, Department of
Anesthesiology and Intensive Care, Far Eastern Federal
University, Vladivostok, Russian Federation

Yermolitskaya M.Z., PhD (Biology), Associate Professor,
Institute of Automation and Control Processes, Far Eastern
Branch, Russian Academy of Sciences, Vladivostok, Russian
Federation

Shumatov V.B., PhD, MD (Medicine), Professor,
Corresponding Member, Russian Academy of Sciences, Head,
Department of Anesthesiology and Intensive Care, Pacific State
Medical University, Vladivostok, Russian Federation

Поступила 07.07.2023
Принята к печати 12.07.2023

Received 07.07.2023
Accepted 12.07.2023

ДИСФУНКЦИИ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ ПРИ ГНОЙНО-ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ ЧЕЛЮСТНО-ЛИЦЕВОЙ ОБЛАСТИ У ДЕТЕЙ

**Митропанова М.Н., Пономаренко Т.А., Чудилова Г.А., Тетерин Ю.В.,
Чапурина В.Н.**

*ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ,
г. Краснодар, Россия*

Резюме. Проблема лечения гнойно-воспалительных заболеваний челюстно-лицевой области (ГВЗ ЧЛО) является весьма актуальной в связи с ростом числа больных этой группы, утяжелением клинического течения, снижением эффективности антибиотикотерапии. Исходы ГВЗ ЧЛО у детей осложняются тем, что поражение зон роста челюстных костей приводит к тяжелым, трудно устранимым деформациям. Увеличилось число случаев затяжного течения воспалительных процессов, хронизации и развития местных и общих осложнений. Причиной этого могут быть нарушения восприимчивости организма к инфекционному агенту, которая определяется состоянием иммунной системы. Цель исследования – выявить особенности функционирования иммунной системы у детей с гнойно-воспалительными заболеваниями челюстно-лицевой области.

Проведено исследование 20 пациентов 8-17 лет с ГВЗ ЧЛО – группа исследования и 13 условно здоровых детей – группа сравнения. Проводили определение содержания Т-лимфоцитов (CD3⁺CD19⁻, CD3⁺CD4⁺, CD3⁺CD8⁺, CD3⁺CD4⁺/CD3⁺CD8⁺) и В-лимфоцитов (CD3⁻CD19⁺), NK (CD3⁻CD16⁺CD56⁺) Cytomics FC-500 (Beckman Coulter, США), концентрации сывороточных IgA, IgM, IgG (ИФА, тест-системы АО «Вектор-Бест», Россия). Фагоцитарную активность нейтрофильных гранулоцитов (НГ) оценивали по количеству активно фагоцитирующих НГ (%ФАН), процессы захвата по показателям (ФЧ, ФИ) и переваривающую активность по %П и ИП по отношению к *S. aureus* (штамм № 209).

Установлены сочетанные дефекты функционирования иммунной системы у детей с ГВЗ ЧЛО: снижение содержания Т-лимфоцитов с параллельным уменьшением доли Т-хелперов и ЦТЛ на фоне неменяющегося содержания NK-клеток и В-лимфоцитов. При этом установлено повышение уровня IgA и IgG. Выявлены дефекты фагоцитоза, связанные, в первую очередь, с процессами завершения фагоцитарного акта, на фоне повышения содержания %ФАН.

Лечение детей с различными видами гнойно-воспалительных заболеваний челюстно-лицевой области до настоящего времени остается актуальной проблемой в стоматологии. Выявленные дис-

Адрес для переписки:

*Митропанова Марина Николаевна
ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский
университет» Министерства здравоохранения РФ
350063, Россия, г. Краснодар, ул. М. Седина, 4.
Тел.: 8 (918) 164-11-10.
E-mail: mmitropanova@mail.ru*

Address for correspondence:

*Marina N. Mitropanova
Kuban State Medical University
4 M. Sedin St
Krasnodar
350063 Russian Federation
Phone: +7 (918) 164-11-10.
E-mail: mmitropanova@mail.ru*

Образец цитирования:

*М.Н. Митропанова, Т.А. Пономаренко, Г.А. Чудилова,
Ю.В. Тетерин, В.Н. Чапурина «Дисфункции иммунной
системы при гнойно-воспалительных заболеваниях
челюстно-лицевой области у детей» // Российский
иммунологический журнал, 2023. Т. 26, № 4. С. 579-586.
doi: 10.46235/1028-7221-13992-ISD*

*© Митропанова М.Н. и соавт., 2023
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0*

For citation:

*M.N. Mitropanova, T.A. Ponomarenko, G.A. Chudilova,
Yu.V. Teterin, V.N. Chapurina "Immune system dysfunction
in purulent inflammatory diseases of the maxillofacial area in
pediatric patients", Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy
Immunologicheskii Zhurnal, 2023, Vol. 26, no. 4, pp. 579-586.
doi: 10.46235/1028-7221-13992-ISD*

*© Mitropanova M.N. et al., 2023
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License*

DOI: 10.46235/1028-7221-13992-ISD

функции иммунного ответа на патогены при ГВЗ ЧЛО во многом объясняют затяжное течение воспалительных процессов, что обуславливает необходимость включения в комплексное лечение, включающее оперативное пособие, общепринятое медикаментозное и физиотерапевтическое лечение иммуотропной терапии с целью увеличения эффективности реабилитации пациентов и профилактики послеоперационных осложнений.

Ключевые слова: дети, гнойно-воспалительные заболевания, челюстно-лицевая область, иммунная система, дисфункции

IMMUNE SYSTEM DYSFUNCTION IN PURULENT INFLAMMATORY DISEASES OF THE MAXILLOFACIAL AREA IN PEDIATRIC PATIENTS

Mitropanova M.N., Ponomarenko T.A., Chudilova G.A., Teterin Yu.V., Chapurina V.N.

Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation

Abstract. The issues of treatment of purulent inflammatory diseases of the maxillofacial region (PMMA) are quite urgent, due to increasing number of such patients. Their clinical course is getting worse, and the efficiency of antibiotic therapy is decreasing. Clinical outcomes of purulent maxillofacial pathology in children are complicated by potential severe local deformities at the growth areas of the jaw bones which are difficult to eliminate. The number of cases of prolonged and chronic inflammatory processes, development of local and general complications is increased. The reason for these complications may be an impaired susceptibility to infectious agents, which is determined by the state of the immune system. Therefore, our aim was to reveal some features of immune functions in children with purulent-inflammatory diseases of maxillofacial area.

The study included a group of pediatric patients 8-17 years old with maxillofacial inflammatory diseases of the maxilla (the study group), and 13 conditionally healthy children (the comparison group). The contents of T cells (CD3⁺CD19⁻, CD3⁺CD4⁺, CD3⁺CD8⁺, CD3⁺CD4⁺/CD3⁺CD8⁺), and B cells (CD3⁻CD19⁺), NK (CD3⁻CD16⁺CD56⁺) was determined using Cytomics FC-500 (Beckman Coulter, USA); concentrations of serum IgA, IgM, IgG were determined by ELISA technique (Vector-Best, Russia). Phagocytic activity of neutrophilic granulocytes (NG) was evaluated as percentage of actively phagocytic NGs, capturing processes were assessed by appropriate phagocytic indices, and the digestive activity was evaluated against *S. aureus* (strain 209).

Combined defects of immune response in children with maxillofacial hypertension were established: decrease of T lymphocytes contents along with decrease of T helpers and CTL ratio along with unchanged content of NK cells and B lymphocytes. Increase of IgA and IgG levels was also found. Defects of phagocytosis were revealed, primarily connected with the processes of completed phagocytosis and increased content of actively phagocytizing NG.

Treatment of children suffering with purulent inflammatory diseases of maxillofacial region is still an urgent problem in dentistry. The revealed dysfunction of immune response to pathogens in the purulent maxillofacial disorders may explain a prolonged clinical course of inflammatory processes, thus determining a need for usage of immunotropic therapy in complex treatment schedules including operative aid as well as conventional drug and physiotherapeutic treatment aiming for increase of rehabilitation efficiency and prevention of postoperative complications in these patients.

Keywords: children, purulent-inflammatory diseases, maxillofacial area, immune system, dysfunction

Исследование выполнено в рамках государственного задания Министерства здравоохранения Российской Федерации № 121031000071-4.

Введение

Изучение проблемы воспалительных заболеваний в детской стоматологии становится осо-

бенно актуальным в связи с увеличением количества больных с данной патологией. Изменение клинического течения, рост числа осложнений приводит к необходимости уделить особое внимание при разработке и усовершенствовании методов диагностики и лечения, изучению патогенетических звеньев данной группы заболеваний [5].

Основная доля заболеваний, диагностируемых в стационаре детской челюстно-лицевой хирургии, приходится на гнойно-воспалительные заболевания челюстно-лицевой области (ГВЗ ЧЛО) и шеи и составляет примерно 40-55% [5]. Наибольшую распространенность среди ГВЗ ЧЛО имеют: острый периостит, острый лимфаденит, фурункул, карбункул, абсцесс, флегмона. Тяжелое течение ГВЗ ЧЛО у детей приводит к формированию зубочелюстных аномалий, патологиям височно-нижнечелюстного сустава (ВНЧС), нарушению роста и развития костей лицевого скелета. В результате развиваются трудно устранимые деформации, нарушения функций и эстетики [5, 7, 10].

Наиболее часто причинными факторами развития острых воспалительных заболеваний челюстно-лицевой области у детей могут быть как одонтогенные, связанные с осложнением хронического периодонтита, так и неодонтогенные. Клиническая картина заболеваний, сопровождающихся воспалительным процессом в ЧЛО у детей, не всегда типична и может не соответствовать этиологическим факторам, вызвавшим их. Так, по данным авторов 76% острых лимфаденитов, диагностированных у детей, обратившихся в стационар челюстно-лицевой хирургии, были неодонтогенной этиологии. Острые лимфадениты, причинами развития которых являются одонтогенные источники инфекции, составили 24% от общего числа исследуемых детей [6].

Этиологией гнойно-воспалительных заболеваний чаще всего являются микроорганизмы, входящие в состав микрофлоры, которая в норме встречается в ротовой полости. Из них можно выделить аэробные бактерии (стафилококки, стрептококки) и анаэробные, представителями которых являются облигатные неспорообразующие – бактероиды, фузобактерии, пептококки и др. [3].

Современный стандарт лечения ГВЗ ЧЛО включает в себя хирургический этап лечения (вскрытие и дренирование гнойного очага) и медикаментозный (антибиотикотерапия, ежедневные перевязки, антисептическая обработка раны) [1].

Бесконтрольное применение антибактериальных препаратов привело к формированию резистентности микроорганизмов к антибиотикам и изменению видового состава и свойств микрофлоры. Это является одним из факторов роста числа детей, обратившихся в стационар челюстно-лицевой хирургии с ГВЗ ЧЛО [8, 5, 12].

Увеличилось число местных и общих осложнений, изменение клинической картины, переход к хроническому течению воспалительных процессов у детей. Причиной этого могут быть наруше-

ния восприимчивости организма к инфекционному агенту, которая определяется состоянием иммунной системы и неспецифическими факторами защиты организма [2, 4, 5, 9, 13, 14].

В связи с этим выявление нарушений функционирования иммунной системы у детей с ГВЗ ЧЛО является актуальным для поиска новых, более эффективных методов лечения включающих в себя традиционный подход и использование местной и системной иммунотерапии [11].

Цель исследования – выявить нарушения функционирования иммунной системы у детей с гнойно-воспалительными заболеваниями челюстно-лицевой области.

Материалы и методы

Исследованы 20 пациентов обоих полов в возрасте 8-17 лет с острым гнойным лимфаденитом и аденофлегмоной лица, одонтогенной флегмоной лица, фурункулом и карбункулом лица, обратившихся за лечением в отделение челюстно-лицевой хирургии ГБУЗ ДККБ г. Краснодар.

Протокол обследования пациента включал в себя сбор субъективных и объективных данных, дополнительные и лабораторные методы обследования. Полученные данные вносились в медицинскую карту стационарного больного (форма № 003/у, утвержденная приказом Минздрава СССР от 04.10.1980 г. № 1030). Было сформировано 2 группы:

Группа исследования – 20 детей с ГВЗ ЧЛО; группа сравнения – 13 условно здоровых детей соответствующего возраста.

При поступлении в стационар до проведения хирургического вмешательства проводили определение содержания Т-лимфоцитов ($CD3^+CD19^-$), Т-хелперов ($CD3^+CD4^+$), Т-цитотоксических лимфоцитов (ЦТЛ, $CD3^+CD8^+$), индекс ИРИ1 ($CD3^+CD4^+/CD3^+CD8^+$) и В-лимфоцитов ($CD3^-CD19^+$), NK ($CD3^-CD16^+CD56^+$) (Cytomics FC-500, Beckman Coulter, США), МкАТ (Beckman Coulter, США). Определяли уровень сывороточных IgA, IgM, IgG (ИФА, тест-системы АО «Вектор-Бест», г. Новосибирск), оценку фагоцитарной активности НГ по количеству активно фагоцитирующих НГ (%ФАН), процессов захвата (ФЧ, ФИ) и переваривающую активность (%П, ИП) по отношению к *S. aureus* (штамм № 209).

Систематизация и статистическая обработка данных проводилась с использованием программного обеспечения Microsoft Office Excel 2019 и онлайн статистического калькулятора (<https://medstatistic.ru/calculators>).

Исследования соответствовали этическим стандартам биоэтического комитета, разработанным в соответствии с Хельсинкской декларацией

всемирной ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» с поправками 2000 г. и «Правилами клинической практики в Российской Федерации», утвержденными Приказом МЗ РФ от 19.06.2003 г. № 266. Родители участвовавших в исследовании детей дали письменное информированное согласие на участие.

Результаты и обсуждение

Острые ГВЗ ЧЛО у детей характеризовались выраженной клинической картиной, сопровождалась общей воспалительной реакцией и интоксикацией с резким подъемом температуры, головной болью, выраженной общей слабостью, нарушением аппетита. В ОАК отмечалось наличие лейкоцитоза $12,5 (8,05-14,84) \times 10^9/\text{л}$ против

6,5 (5,3-7,05) в группе сравнения ($p < 0,05$), со сдвигом влево (ПЯЛ 8,0 (7,0-11,0) %).

Изучение показателей клеточного и гуморального иммунитета позволило выявить у детей ГВЗ челюстно-лицевой области наличие сочетанных количественных дефектов как клеточного, так гуморального иммунитета и функциональной активности нейтрофильных гранулоцитов (НГ).

В группе исследования детей с ГВЗ ЧЛО отмечалось снижение в 1,2 раза относительного содержания Т-лимфоцитов ($CD3^+CD19^+$) ($p < 0,05$) и в 1,3 раза Т-хелперов ($CD3^+CD4^+$) ($p < 0,05$) и тенденция уменьшения ЦТЛ ($CD3^+CD8^+$) ($p > 0,05$). Такие изменения характеризуют нарушение количественного соотношения лимфоцитов с хелперной и цитотоксической активностью, что отражает ИРИ1 – 1,2 (0,96; 1,33) ($p < 0,05$). Также

ТАБЛИЦА 1. СОСТОЯНИЕ КЛЕТОЧНОГО И ГУМОРАЛЬНОГО ИММУНИТЕТА У ДЕТЕЙ 8-17 ЛЕТ С ГНОЙНО-ВОСПАЛИТЕЛЬНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ ЧЕЛЮСТНО-ЛИЦЕВОЙ ОБЛАСТИ, Me ($Q_{0,25}-Q_{0,75}$)

TABLE 1. STATE OF CELLULAR AND HUMORAL IMMUNITY IN CHILDREN AGED 8-17 YEARS WITH PURULENT-INFLAMMATORY DISEASES OF THE MAXILLOFACIAL REGION, Me ($Q_{0,25}-Q_{0,75}$)

Показатели Indicators	Группа сравнения условно здоровые дети Comparison group conditionally healthy children		Группа исследования Study group	
	%	$10^9/\text{л}$ $10^9/\text{L}$	%	$10^9/\text{л}$ $10^9/\text{L}$
L		6,5 (5,30-7,05)		12,5* (8,05-14,84)
Лимфоциты Lymphocytes	32,25 (31,50-33,43)	2,09 (1,67-2,36)	24,0* (21,0-27,0)	2,16 (1,95-3,02)
CD3⁺CD19⁺	75,73 (71,75-78,18)	1,58 (1,20-2,78)	65,4* (57,37-69,25)	1,67 (1,35-1,96)
CD3⁺CD4⁺	46,05 (41,31-47,65)	1,13 (0,77-1,63)	35,11* (33,86-38,64)	0,86 (0,84-0,97)
CD3⁺CD8⁺	30,13 (28,93-33,43)	0,64 (0,59-0,78)	26,95 (21,61-28,94)	0,58 (0,51-0,81)
CD3⁺CD4⁺/CD3⁺CD8⁺	1,5 (1,46-1,82)		1,2 (0,96-1,33)	
CD3⁺CD19⁺	19,00 (17,12-19,10)	0,39 (0,28-0,45)	15,74 (11,46-17,65)	0,33 (0,22-0,46)
CD3⁺CD16⁺CD56⁺	11,42 (7,68-13,20)	0,24 (0,23-0,34)	9,40 (6,00-13,97)	0,18 (0,14-0,26)
IgA, г/л IgA, g/L	1,31 (1,04-1,57)		1,94 (1,74-2,14)*	
IgM, г/л IgM, g/L	1,04 (1,01-1,12)		1,01 (0,82-1,57)	
IgG, г/л IgG, g/L	13,06 (11,92-13,55)		14,61 (13,95-15,01)*	

Примечание. * – отличия показателей группы исследования детей с ГВЗ ЧЛО от показателей условно здоровых детей ($p < 0,05$).

Note. *, differences in the indicators of the study group of children with purulent-inflammatory diseases of the maxillofacial region from the indicators of conditionally healthy children ($p < 0.05$).

ТАБЛИЦА 2. ФАГОЦИТАРНАЯ АКТИВНОСТЬ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ У ДЕТЕЙ 8-15 ЛЕТ С ГНОЙНО-ВОСПАЛИТЕЛЬНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ ЧЕЛЮСТНО-ЛИЦЕВОЙ ОБЛАСТИ, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 2. PHAGOCYtic ACTIVITY OF NEUTROPHILIC GRANULOCYTES IN CHILDREN AGED 8-15 YEARS WITH PURULENT-INFLAMMATORY DISEASES OF THE MAXILLOFACIAL REGION, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

Показатели Indicators	Группа исследования Study group n = 20	Группа сравнения условно здоровые дети Comparison group conditionally healthy children n = 13
%НГ %NG	67,0* (61,0-70,0)	57,8 (54,3-59,8)
%СЯЛ %SNG	57 (53,0-63,0)	55,5 (54,1-58,0)
%ПЯЛ %BNG	8,0* (6,0-11,0)	2,5 (1,0-3,5)
%ФАН %PhAN	71,0* (62,0-76,0)	54,7 (51,0-57,0)
ФЧ PhN	2,8* (2,50-3,23)	4,4 (3,8-4,7)
ФИ PhI	2,0 (1,68-2,30)	1,9 (1,7-2,2)
%П %D	43,8* (38,74-46,50)	64,5 (62,6-66,9)
ИП ID	0,94 (0,72-0,99)	1,7 (1,5-2,0)

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. As for Table 1.

показано снижение относительного содержания NK (CD3⁺CD16⁺CD56⁺) лимфоцитов ($p > 0,05$) (табл. 1).

Следует отметить, что в пересчете на абсолютное содержание Т-лимфоцитов, субпопуляций Т-хелперов и ЦТЛ, а также NK-клеток их значения значимо не отличаются от значений группы сравнения ($p_{1,4} > 0,05$), что свидетельствует об отсутствии адекватной реакции на воспалительный процесс на фоне лейкоцитоза.

На фоне отсутствия количественных изменений В-лимфоцитов (CD3⁺CD19⁺) ($p > 0,05$) выявлено повышение концентрации сывороточных иммуноглобулинов IgA и IgG ($p_{1,2} < 0,05$) по отношению к значениям группы сравнения (табл. 1).

Анализ количественных показателей фагоцитарной активности НГ показал, что у детей группы исследования на фоне повышения в 1,3 раза процента активно фагоцитирующих НГ (%ФАН) ($p < 0,05$) наблюдается нарушение функций захвата в виде снижения ФЧ ($p < 0,05$) и ФИ ($p > 0,05$) относительно показателей группы сравнения. Также установлено значимое снижение процессов киллинга и переваривания бактериального антигена (%П, ИП) ($p_{1,2} < 0,05$) (табл. 2).

Таким образом, установлены сочетанные дефекты функционирования иммунной системы у

детей с ГВЗ ЧЛО 8-17 лет: снижение содержания Т-лимфоцитов с параллельным уменьшением доли Т-хелперов и ЦТЛ, клеток на фоне неменяющегося содержания NK-клеток и В-лимфоцитов. При этом установлено повышение уровня IgA и IgG. Выявлены дефекты фагоцитоза, связанные в первую очередь с процессами завершения фагоцитарного акта.

Заключение

Лечение детей с различными видами гнойно-воспалительных заболеваний челюстно-лицевой области до настоящего времени остается наиболее важной проблемой в стоматологии и детской челюстно-лицевой хирургии. Выявленные дисфункции иммунного ответа на патогены при ГВЗ ЧЛО во многом объясняют затяжное течение воспалительных процессов. Это обуславливает необходимость включения в комплексное лечение, помимо оперативного, общепринятого медикаментозного и физиотерапевтического, – иммуотропной терапии. Данный подход может привести к сокращению сроков реабилитации пациентов и эффективной профилактике послеоперационных осложнений.

Список литературы / References

1. Амануллаев Р.А., Икрамов Г.А., Сапарбаев М.К., Рузибаев Д.Р. Современные аспекты комплексного лечения гнойно-воспалительных заболеваний челюстно-лицевой области // Интегративная стоматология и челюстно-лицевая хирургия, 2022. Т. 1, № 1. С. 23-26. [Amanullaev R.A., Ikramov G.A., Saparbaev M.K., Ruzibaev D.R. Modern aspects of complex treatment of purulent-inflammatory diseases of the maxillofacial region. *Integrativnaya stomatologiya i chelyustno-litsevaya Khirurgiya = Integrative Dentistry and Maxillofacial Surgery*, 2022, Vol. 1, no. 1, pp. 23-26. (In Russ.)]
2. Анохина И.В., Забелин А.С., Слабкая Е.В. Особенности иммунной реактивности детей с острым лимфаденитом лица и шеи // Смоленский медицинский альманах, 2020. № 3. С. 24-28. [Anokhina I.V., Zabelin A.S., Slabkaya E.V. Features of immune reactivity of children with acute lymphadenitis of the face and neck. *Smolenskiy meditsinskiy almanakh = Smolensk Medical Almanac*, 2020, no. 3, pp. 24-28. (In Russ.)]
3. Бирмуханова А.У., Курашев А.Г., Шалабаева К.З., Молдажанова А.Г., Токбергенова А.Т. Обзор литературы. эпидемиологический анализ одонтогенных воспалительных заболеваний челюстно-лицевой области детского населения карагандинской области // Евразийское Научное Объединение, 2019. № 12-2 (58). С. 125-129. [Birmukhanova A.U., Kurashev A.G., Shalabaeva K.Z., Moldazhanova A.G., Tokbergenova A.T. Literature review. epidemiological analysis of odontogenic inflammatory diseases of the maxillofacial region of the children's population of the Karaganda region. *Evraziyskoe Nauchnoe Obyedinenie = Eurasian Scientific Association*, 2019, no. 12-2 (58), pp. 125-129. (In Russ.)]
4. Бухов М.В. Характеристика иммунологических показателей у детей с воспалительными заболеваниями челюстно-лицевой области в зависимости от возрастных особенностей // Наука и новые технологии, 2009. № 6. С. 128-130. [Bukhov M.V. Characteristics of immunological parameters in children with inflammatory diseases of the maxillofacial region, depending on age characteristics. *Nauka i novye tekhnologii = Science And New Technologies*, 2009, no. 6, pp. 128-130. (In Russ.)]
5. Железный П.А., Колыбелкин М.В., Изюмов А.О., Апраксина Е.Ю., Железная А.П. Характеристика одонтогенных и неодонтогенных воспалительных процессов челюстно-лицевой области у детей, проходивших лечение в челюстно-лицевом стационаре // Journal of Siberian Medical Sciences, 2018. № 3. С. 31-39. [Zhelezny P.A., Kolybelkin M.V., Izyumov A.O., Apraksina E.Yu., Zheleznaya A.P. Characteristics of odontogenic and non-odontogenic inflammatory processes of the maxillofacial region in children treated in a maxillofacial hospital. *Journal of Siberian Medical Sciences = Journal of Siberian Medical Sciences*, 2018, no. 3, pp. 31-39. (In Russ.)]
6. Забелин А.С., Анохина И.В., Петрущенко О.В. Дифференциальная диагностика лимфаденита лица и шеи у детей // Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия: Медицина. Фармация, 2011. № 16-1 (111). С. 125-129. [Zabelin A.S., Anokhina I.V., Petrushchenkova O.V. Differential diagnosis of lymphadenitis of the face and neck in children. *Nauchnye vedomosti Belgorodskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya: Meditsina. Farmatsiya = Scientific statements of the Belgorod State University. Series: Medicine. Pharmacy*, 2011, no. 16-1 (111), pp. 125-129. (In Russ.)]
7. Изюмов А.О., Носкова Е.В., Колыбелкин М.В., Апраксина Е.Ю., Бородин Т.В., Климова И.В., Щелкунов К.С. Воспалительные заболевания челюстно-лицевой области у детей // Медицина и образование в Сибири, 2015. № 5. С. 43. [Izyumov A.O., Noskova E.V., Kolybelkin M.V., Apraksina E.Yu., Borodina T.V., Klimova I.V., Shchelkunov K.S. Inflammatory diseases of the maxillofacial region in children. *Meditsina i obrazovanie v Sibiri = Medicine and Education in Siberia*, 2015, no. 5, P. 43. (In Russ.)]
8. Кабанова С.А. Антибактериальная терапия гнойно-воспалительных заболеваний челюстно-лицевой области у детей // Смоленский медицинский альманах, 2020. № 3. С. 103-106. [Kabanova S.A. Antibacterial therapy of purulent-inflammatory diseases of the maxillofacial region in children. *Smolenskiy meditsinskiy almanakh = Smolensk Medical Almanac*, 2020, no. 3, pp. 103-106. (In Russ.)]
9. Кабанова А.А. Показатели иммунного статуса пациентов с инфекционно-воспалительными заболеваниями челюстно-лицевой области и шеи в зависимости от распространенности процесса // Медицина и экология, 2019. № 1 (90). С. 69-76. [Kabanova A.A. Indicators of the immune status of patients with infectious and inflammatory diseases of the maxillofacial region and neck, depending on the prevalence of the process. *Meditsina i ekologiya = Medicine and Ecology*, 2019, no. 1 (90), pp. 69-76. (In Russ.)]
10. Каландаров Н.С., Ушницкий И.Д., Чахов А.А. Частота и структура одонтогенных воспалительных заболеваний челюстно-лицевой области у детей и подростков (по материалам детского челюстно-лицевого отделения рб № 1-НЦМ) // В сборнике: Актуальные проблемы и перспективы развития стоматологии в условиях Севера. – Сборник научно-исследовательских работ студентов стоматологического отделения Медицинского института Северо-Восточного федерального университета имени М.К. Аммосова. Якутск, 2018. С. 33-37. [Kalandarov N.S., Ushnitsky I.D., Shakhov A.A. Frequency and structure of odontogenic inflammatory diseases of the maxillofacial region in children and adolescents (based on the materials of the children's maxillofacial department of RB No. 1-NCM). In the collection: Current problems and prospects for the development of dentistry in the conditions of the North. Collection of research papers of students of the Dental Department of the Medical Institute of the Northeastern Federal University named after M.K. Ammosov]. Yakutsk, 2018, pp. 33-37.

11. Нестерова И.В., Чудилова Г.А., Чапурина В.Н., Ковалева С.В., Тетерин Ю.В., Барова Н.К., Лягуша Д.Э., Тараканов В.А. Клинико-иммунологическая эффективность программы иммунотерапии в послеоперационном лечении детей с различными формами острых перитонитов // Медицинская иммунология, 2022. Т. 24, № 3. С. 553-572. [Nesterova I.V., Chudilova G.A., Chapurina V.N., Kovaleva S.V., Teterin Yu.V., Barova N.K., Lyagusha D.E., Tarakanov V.A. Clinical and immunological effectiveness of the immunotherapy program in the postoperative treatment of children with various forms of acute peritonitis. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2022, Vol. 24, no. 3, pp. 553-572. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-CAI-2470.

12. Нестерова И.В., Чудилова Г.А., Чапурина В.Н., Ковалева С.В., Ломтатидзе Л.В., Барова Н.К., Тараканов В.А. Сравнительное клинико-иммунологическое исследование эффективности комплексного послеоперационного лечения, включающего программы иммуномодулирующей терапии имунофаном, с традиционными методами послеоперационного ведения детей с различными формами нетипично протекающих острых перитонитов // Эффективная фармакотерапия, 2022. Т. 18, № 37. С. 8-19. [Nesterova I.V., Chudilova G.A., Chapurina V.N., Kovaleva S.V., Lomtadidze L.V., Barova N.K., Tarakanov V.A. Comparative clinical and immunological study of the effectiveness of complex postoperative treatment, including programs of immunomodulatory therapy with imunofan, with traditional methods of postoperative management of children with various forms of atypical acute peritonitis. *Effektivnaya farmakoterapiya = Effective Pharmacotherapy*, 2022, Vol. 18, no. 37, pp. 8-19. (In Russ.)]

13. Нестерова И.В., Чудилова Г.А., Митропанова М.Н., Павленко В.Н., Ломтатидзе Л.В., Ковалева С.В., Тараканов В.А., Барова Н.К. Экспериментальное переориентирование фенотипа функционально значимых субпопуляций и микробицидной активности нейтрофильных гранулоцитов детей с гнойно-воспалительными заболеваниями под влиянием глюкозаминилмурамилдипептида в системе *in vitro* // Медицинская иммунология, 2021. Т. 23, № 1. С. 49-62. [Nesterova I.V., Chudilova G.A., Mitropanova M.N., Pavlenko V.N., Lomtadidze L.V., Kovaleva S.V., Tarakanov V.A., Barova N.K. Experimental reorientation of the phenotype of functionally significant subpopulations and microbicidal activity of neutrophilic granulocytes in children with pyoinflammatory diseases under the influence of glucosaminylmuramyl dipeptide in the *in vitro* system. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2021, Vol. 23, no. 1, pp. 49-62. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-IVP-2136.

14. Чудилова Г.А., Нестерова И.В., Русинова Т.В., Ковалева С.В., Павленко В.Н., Тараканов В.А., Барова Н.К. Системная и локальная эффекторная функция нейтрофильных гранулоцитов, ассоциированная с трансформацией фенотипа их функционально-значимых субпопуляций у детей с малой гнойной инфекцией мягких тканей // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Медицина, 2020. Т. 24, № 3. С. 218-226. [Chudilova G.A., Nesterova I.V., Rusinova T.V., Kovaleva S.V., Pavlenko V.N., Tarakanov V.A., Barova N.K. Systemic and local effector function of neutrophilic granulocytes associated with the transformation of the phenotype of their functionally significant subpopulations in children with minor purulent infection of soft tissues. *Vestnik Rossiyskogo universiteta druzhby narodov. Seriya: Meditsina = Bulletin of Peoples' Friendship University of Russia. Series: Medicine*, 2020, Vol. 24, no.3, pp. 218-226. (In Russ.)]

Авторы:

Митропанова М.Н. — д.м.н., доцент, заведующая кафедрой детской стоматологии, ортодонтии и челюстно-лицевой хирургии ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Краснодар, Россия

Пonomarenko Т.А. — ассистент кафедры детской стоматологии, ортодонтии и челюстно-лицевой хирургии ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Краснодар, Россия

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

Authors:

Mitropanova M.N., PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Head, Department of Pediatric Dentistry, Orthodontics and Maxillofacial Surgery, Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation

Ponomarenko T.A., Assistant Professor, Department of Pediatric Dentistry, Orthodontics and Maxillofacial Surgery, Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation

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

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

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

Чапурина В.Н. — ассистент кафедры клинической иммунологии, аллергологии и лабораторной диагностики ФПК и ППС ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Краснодар, Россия

Chapurina V.N., Assistant Professor, Department of Clinical Immunology, Allergology and Laboratory Diagnostics Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation

Поступила 13.07.2023
Принята к печати 16.07.2023

Received 13.07.2023
Accepted 16.07.2023

АНАЛИЗ РЕГУЛЯТОРНЫХ Т-ЛИМФОЦИТОВ У ПАЦИЕНТОВ С ЧЕРЕПНО-МОЗГОВОЙ ТРАВМОЙ

Норка А.О.^{1,2}, Воробьев С.В.³, Кузнецова Р.Н.^{1,2},
Серебрякова М.К.⁴, Кудрявцев И.В.^{1,4}, Коваленко С.Н.⁵,
Монашенко Д.Н.⁶

¹ ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова», Санкт-Петербург, Россия

² ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера», Санкт-Петербург, Россия

³ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

⁴ ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

⁵ ФГБОУ ВО «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова», Санкт-Петербург, Россия

⁶ СПб ГБУЗ «Городская больница № 26», Санкт-Петербург, Россия

Резюме. В последние годы черепно-мозговая травма является одной из наиболее актуальных медицинских и социальных проблем, что обусловлено его распространенностью, поражением преимущественно лиц молодого, трудоспособного возраста, высокой летальностью, инвалидизацией и экономическими затратами на лечение и последующую реабилитацию пациентов. В настоящее время доказано участие иммунной системы организма в развитии нейровоспалительного процесса в ответ на травматическое повреждение головного мозга. Важными факторами, определяющими исход заболевания, являются популяции Трег, участвующие в индукции иммунологической толерантности, в качестве значимого компонент иммунорегуляции. В результате нашего исследования было обнаружено снижение относительного содержания Трег в рамках общего лимфоцитарного пула, имеющего фенотип CD3⁺CD4⁺CD25^{bright} в периферической крови пациентов 3-й (УСТ) и 4-й (УТС) групп в сравнении с данными группы контроля, а также снижение уровня относительного содержания Трег (CD4⁺CD25⁺Т-клетки), что обусловлено степенью повреждения нервной ткани и, как результат, их миграцией для подавления воспаления за счет продукции противовоспалительных цитокинов (TGF-β, IL-10). Популяция Трег неоднородна, поэтому в рамках исследования был проведен анализ распределения Трег по субпопуляциям, выявленным на основании экспрессии CD45RO и CD62L. При оценке субпопуляций регуляторных Т-лимфоцитов в рамках CD45RO и CD62L были установлены значимые изменения только у пациентов с ушибом головного мозга. Выявлены изменения в рамках пула «наивных» Т-регуляторных лимфоцитов с фенотипом CD3⁺CD4⁺CD25^{bright}CD39⁺ Трег,

Адрес для переписки:

Норка Анна Олеговна
ФБУН «Санкт-Петербургский
научно-исследовательский институт эпидемиологии
и микробиологии имени Пастера»
197101, Россия, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14.
Тел.: 8 (911) 218-85-00.
E-mail: norka-anna@mail.ru

Address for correspondence:

Anna O. Norka
Saint Petersburg Pasteur Institute
14 Mira St
St. Petersburg
197101 Russian Federation
Phone: +7 (911) 218-85-00.
E-mail: norka-anna@mail.ru

Образец цитирования:

А.О. Норка, С.В. Воробьев, Р.Н. Кузнецова,
М.К. Серебрякова, И.В. Кудрявцев, С.Н. Коваленко,
Д.Н. Монашенко «Анализ регуляторных Т-лимфоцитов
у пациентов с черепно-мозговой травмой»
// Российский иммунологический журнал, 2023. Т. 26,
№ 4. С. 587-592.
doi: 10.46235/1028-7221-13981-AOR

© Норка А.О. и соавт., 2023

Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

A.O. Norka, S.V. Vorobyev, R.N. Kuznetsova,
M.K. Serebriakova, I.V. Kudryavtsev, S.N. Kovalenko,
D.N. Monashenko "Analysis of regulatory T lymphocytes
in patients with traumatic brain injury", Russian Journal
of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2023,
Vol. 26, no. 4, pp. 587-592.
doi: 10.46235/1028-7221-13981-AOR

© Norka A.O. et al., 2023

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

DOI: 10.46235/1028-7221-13981-AOR

способных к продукции широкого спектра цитокинов, специфичных для Th1, Th2, Th17, у пациентов с ушибом легкой, средней и тяжелой степени тяжести, в то время как уровень высокоактивных CD3⁺CD4⁺CD25^{bright}CD73⁺ Treg был достоверно снижен у пациентов с ушибом средней и тяжелой степени тяжести. Данные изменения указывают на нарушение равновесия в иммунорегуляторных процессах как результат обширности повреждения тканей головного мозга.

Ключевые слова: черепно-мозговая травма, субпопуляции лимфоцитов, регуляторные T-лимфоциты, воспаление, иммунофенотипирование, проточная цитофлуориметрия

ANALYSIS OF REGULATORY T LYMPHOCYTES IN PATIENTS WITH TRAUMATIC BRAIN INJURY

Norka A.O.^{a, b}, Vorobyev S.V.^c, Kuznetsova R.N.^{a, b}, Serebriakova M.K.^d, Kudryavtsev I.V.^{a, d}, Kovalenko S.N.^e, Monashenko D.N.^f

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

^b Saint Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation

^c V. Almazov National Medical Research Centre, St. Petersburg, Russian Federation

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

^e S. Kirov Military Medical Academy, St. Petersburg, Russian Federation

^f St. Petersburg City Hospital No. 26, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. In recent years, traumatic brain injury (TBI) has been one of the most urgent medical and social problems due to its prevalence, predominantly affecting young people of working age, causing high mortality, disability and economic costs for treatment and subsequent rehabilitation of patients. At present, the role of patients' immune system in evolving neuroinflammation after traumatic brain injury has been proven. Treg cell populations represent an important factor determining the outcome of the disease due to promoting induction of immunological tolerance, being a significant component of immunoregulation. As a result of our study, we found a decrease in the relative content of Treg within the total lymphocyte pool of peripheral blood, which has the CD3⁺CD4⁺CD25^{bright} phenotype in patients of the 3rd and 4th groups, in comparison with the data from control group. Moreover, a decreased relative content of Tregs (CD4⁺CD25⁺T cells) was revealed which is due to the degree of brain tissue damage and, as a result, their migration to suppress inflammation due to production of anti-inflammatory cytokines (TGF-β, IL-10). The Treg population is heterogeneous, thus prompting us for analysis of the Treg subpopulations profile based on the expression of CD45R0 and CD62L. When assessing subpopulations of regulatory T lymphocytes within CD45R0 and CD62L, significant changes were found only in patients with brain contusion. The changes were revealed within the pool of "naive" T regulatory lymphocytes with the CD3⁺CD4⁺CD25^{bright}CD39⁺ Treg phenotype, capable of producing a wide range of cytokines specific for Th1, Th2, Th17, in patients with mild, moderate and severe TBI. Meanwhile, the level of highly active CD3⁺CD4⁺CD25^{bright}CD73⁺ Tregs was significantly reduced in patients with moderate and severe TBI. These changes indicate an imbalance in immunoregulatory processes resulting from extensive damage to brain tissues.

Keywords: traumatic brain injury, subpopulations of lymphocytes, Treg, inflammatory, multicolor immunophenotyping, flow cytometry

Введение

Черепно-мозговая травма (ЧМТ) является одной из наиболее актуальных медицинских и социальных проблем и относится к числу наиболее часто встречаемых форм патологии неврологического профиля. Частота ее возникновения достигает 100-749 человек в расчете на 100 тысяч населения [4, 9]. По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), среди всех травматиче-

ских повреждений ЧМТ характеризуется высоким уровнем летального исхода и инвалидизации (30-77%) [4], а гетерогенность вариантов предопределяет возникновение трудностей в оценке степени тяжести и прогнозировании раннего исхода заболевания.

При этом в последние годы доказано участие иммунной системы организма в развитии нейровоспалительного процесса в ответ на травматическое и другое повреждение мозга [5, 6].

Воспаление играет ключевую роль в патогенезе травматической болезни. Клетки иммунной системы вовлечены на всех стадиях нейровоспалительного каскада, начиная от процессов повреждения и репарации. При этом ключевой популяцией, обладающей супрессивной активностью, тем самым защищая нервную ткань от травматического повреждения, обладает популяция Treg [8].

Treg секретируют цитокины с противовоспалительной активностью (IL-10, TGF- β), ингибируют активность субпопуляций Т-хелперов и цитотоксических Т-клеток локально и на периферии. Так, усиление активности Treg приводит к уменьшению размеров поражения нервной ткани [7]. Протективный эффект Treg обусловлен как подавлением нейровоспалительного процесса, так и усилением нейрогенеза путем стимуляции процессов посттравматической неоваскуляризации.

Таким образом, одним из ключевых механизмов сдерживания гиперактивных иммунологических ответов после травматического повреждения головного мозга является активация FoxP3⁺Treg. Однако в настоящее время, несмотря на накопленный объем знаний, не существует окончательной парадигмы о вовлечении субпопуляций FoxP3⁺Treg в иммунопатогенезе травматической болезни в остром периоде.

Целью исследования является изучение роли регуляторных Т-лимфоцитов в патогенезе черепно-мозговой травмы различной степени тяжести.

Материалы и методы

Объектом исследования служила венозная кровь больных с ЧМТ различной степени тяжести ($n = 110$) в возрасте от 20 до 55 лет. Согласно международной классификации, все пациенты были разделены на 4 группы [3]: 1-я группа — больные с сотрясением головного мозга (СТГ); 2-я группа — с ушибом головного мозга легкой степени тяжести (УЛС); 3-я группа — с ушибом головного мозга средней степени тяжести (УСС); 4-я группа — с ушибом тяжелой степени тяжести (УТС). В контрольную группу вошли 48 практически здоровых лиц (женщины — 26 человек, мужчины — 22 человека) в возрасте от 18 до 55 лет (средний возраст $42,3 \pm 11,3$ года), которые были донорами отделения переливания крови Первого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета имени акад. И.П. Павлова.

С целью оценки субпопуляционного состава регуляторных Т-лимфоцитов собирались образцы венозной крови в вакуумные пробирки с содержанием КЗЭДТА. Все исследования проводились в день взятия крови. Подготовку образцов периферической крови и настройку проточного

цитофлуориметра проводили в соответствии с рекомендациями, изложенными Байдуном и соавторами [1]. Для выявления основных субпопуляций Т-лимфоцитов и оценки уровня экспрессии ими CD39 и CD73 применялась панель моноклональных антител. К образцам периферической крови пациентов (100 мкл) вносили АТ в соответствии с рекомендациями производителя, после чего инкубировали 15 мин при комнатной температуре в защищенном от света месте [2]. Удаление эритроцитов из образцов проводили по безотмывочной технологии с использованием лизирующего раствора VersaLyse, к 975 мкл которого ex tempore добавляли 25 мкл фиксирующего раствора IOTest 3 Fixative Solution, методом проточной цитофлуориметрии с использованием диагностического прибора Navios (Beckman Coulter, США), оснащенного тремя лазерами с длинами волн излучения 405, 488 и 638 нм. Обработка данных проводилась с использованием программ: Navios Software v.1.2, KaluzaTM v.2.0 (Beckman Coulter, США). Результаты содержания лимфоцитов представлены в виде: % — процента содержания от общего числа лимфоцитов или исследуемой популяции лимфоцитов; абсолютного (кл/мкл, количество клеток в 1 мкл периферической крови) числа лимфоцитов. Статистическую обработку проводили при помощи программного обеспечения GraphPad Prism 6.00 (GraphPad Prism for Mac, США). Результаты были выражены в виде медианы (Me) и интерквартильного диапазона ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$). Для сравнения парных количественных значений полученных выборок использовали непараметрический критерий Манна-Уитни.

Результаты и обсуждение

По результатам исследования относительного содержания Treg в рамках общего лимфоцитарного пула, имеющих фенотип CD3⁺CD4⁺CD25^{bright}, в периферической крови выявлен пониженный уровень: с 3,3% (2,8-3,8) до 2,8% (2,5-3,3) у пациентов в 3-й (УСС) и до 2,6% (2,0-3,3) в 4-й группе (УТС), что логично согласуется с концепцией о перераспределении и последующей миграции клеток эффекторов в очаг воспаления.

Необходимо отметить, что популяция Treg неоднородна, поэтому в рамках исследования был проведен анализ распределения Treg по субпопуляциям, выявленным на основании экспрессии CD45RO и CD62L.

При оценке субпопуляций регуляторных Т-лимфоцитов в рамках CD45RO и CD62L были установлены значимые изменения только у пациентов с ушибом головного мозга. Это свидетельствует о том, что, возможно, степень тяжести травмы обуславливает степень активации Treg. Проведенный анализ показал достоверно по-

ниженный уровень относительного количества «наивных» Treg: 19,8% (13,0-32,4) при $p = 0,008$ во 2-й группе (УЛС), 21,1% (14,0-29,0) при $p = 0,002$ в 3-й группе (УСС) и 14,9% (12,4-30,0) при $p = 0,0004$ в 4-й группе (УТС) против 32,4% (26,6-37,8). Схожие изменения были выявлены в рамках абсолютных значений в виде пониженного уровня у всех пациентов с ушибом головного мозга ($p < 0,05$). При этом Treg «эффекторной памяти» имели достоверно повышенный относительный уровень в 3-й (УСС) ($p = 0,003$) и 4-й группах (УТС): 63,3% (63,0-81,6) при $p = 0,003$ и 61,7% (53,5-73,4) при $p = 0,016$, соответственно, против 55,5% (47,7-59,6). Абсолютное содержание также было повышено в 3-й (УСС) ($p = 0,013$) и 4-й группах (УТС) ($p = 0,033$): 5,4 кл/мкл (2,4-6,4) при $p = 0,013$ и 4,2 кл/мкл (2,42,8-7,4) при $p = 0,033$, соответственно, против 8,8 кл/мкл (4,4-9,2). Достоверных изменений абсолютного и относительного количества Treg «центральной памяти» обнаружено не было ($p > 0,05$) ни в од-

ной из обследованных групп. Результаты приведены в таблице 1.

Не менее важным является анализ, основанный на уровне экспрессии CD39 и CD73 (2 основные нуклеотидазы, осуществляющие расщепление АТФ до АДФ, пирофосвата и АМФ, а также аденозина и фосфата соответственно). Так, были проанализированы субпопуляции Treg, ко-экспрессирующие CD39 или CD73 на мембранах. Среди «наивных» Treg был выявлен повышенный уровень CD39-позитивных лимфоцитов: 0,2% (0,02-0,4) при $p = 0,015$ во 2-й (УЛС), 0,2% (0,01-0,7) при $p = 0,027$ в 3-й (УСС) и 0,09% (0,01-0,3) при $p = 0,006$ в 4-й группах (УТС) против 0,7% (0,2-1,2). Относительное содержание «наивных» Treg, экспрессирующих CD73, было установлено повышенное содержание в 3-й (УСС) и 4-й группах (УТС): 1,3% (0,2-3,7) при $p = 0,022$ и 1,5% (0,002-5,1) при $p = 0,048$, соответственно, против 4,2% (2,6-5,5). Результаты приведены в таблице 2.

ТАБЛИЦА 1. ОТНОСИТЕЛЬНОЕ И АБСОЛЮТНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РЕГУЛЯТОРНЫХ Т-ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ БОЛЬНЫХ С ЧЕРЕПНО-МОЗГОВОЙ ТРАВМОЙ, НАХОДЯЩИХСЯ НА РАЗЛИЧНЫХ СТАДИЯХ СОЗРЕВАНИЯ, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 1. RELATIVE AND THE ABSOLUTE NUMBER OF REGULATORY T CELL SUBSETS IN PERIPHERAL BLOOD FROM PATIENTS WITH TRAUMATIC BRAIN INJURY, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

Популяция Treg Treg population	Фенотип Phenotype	Группа 1 Group 1	Группа 2 Group 2	Группа 3 Group 3	Группа 4 Group 4	Группа 5 Group 5	p	
«Наивные» Treg "Naive" Treg	CD45RO ⁺ CD62L ⁺	%	26,7 (20,7-37,8)	19,8 (13,0-32,4)	21,1 (14,0-29,0)	14,9 (12,4-30,0)	32,4 (26,6-37,8)	$p_{1-4} = 0,005$ $p_{2-5} = 0,008$ $p_{3-5} = 0,002$ $p_{4-5} = 0,0004$
		кл/мл cell/mL	13,6 (3,6-22,4)	4,8 (2,8-16,5)	8,6 (3,8-15,4)	7,9 (3,8-13,6)	19,0 (12,8-25,5)	$p_{1-2} = 0,024$ $p_{2-5} = 0,001$ $p_{3-5} = 0,007$ $p_{4-5} = 0,001$
Treg центральной памяти Central memory Treg	CD45RO ⁺ CD62L ⁺	%	57,9 (53,8-65,0)	61,1 (49,0-76,0)	63,3 (37,0-74,0)	61,7 (53,0-73,4)	55,5 (48,0-59,6)	
		кл/мл cell/mL	29,0 (21,5-33,2)	23,1 (15,3-38,1)	17,2 (12,8-36,7)	21,3 (11,5-42,1)	29,0 (24,8-45,0)	
Treg эффекторной памяти Effector memory Treg	CD45RO ⁺ CD62L ⁻	%	57,9 (53,8-65,0)	61,1 (49,0-76,0)	63,3 (63,0-81,6)	61,7 (53,5-73,4)	55,5 (47,7-59,6)	$p_{1-3} = 0,015$ $p_{3-5} = 0,03$ $p_{4-5} = 0,016$
		кл/мл cell/mL	4,8 (2,5-15,5)	3,8 (2,8-11,9)	5,4 (2,4-6,4)	4,2 (2,8-7,4)	8,8 (4,4-9,2)	$p_{3-5} = 0,013$ $p_{4-5} = 0,033$

Примечание. % – процент содержания от общей популяции регуляторных Т-лимфоцитов; группа 1 – сотрясение головного мозга; группа 2 – ушиб легкой степени тяжести; группа 3 – ушиб средней степени тяжести; группа 4 – ушиб тяжелой степени тяжести; группа 5 – контрольная группа; $p_{1-2}, p_{1-3}, p_{1-4}, p_{1-5}, p_{2-3}, p_{2-4}, p_{2-5}, p_{3-4}, p_{3-5}, p_{4-5}$ – различия между соответствующими группами.

Note. % Tregs out of total lymphocyte count; group 1 – concussion; group 2 – mild brain contusion; group 3 – moderate brain contusion; group 4 – severe brain contusion; group 5 – control group; $p_{1-2}, p_{1-3}, p_{1-4}, p_{1-5}, p_{2-3}, p_{2-4}, p_{2-5}, p_{3-4}, p_{3-5}, p_{4-5}$ – differences between the respective groups.

ТАБЛИЦА 2. СОДЕРЖАНИЕ CD39- И CD73- ПОЗИТИВНЫХ РЕГУЛЯТОРНЫХ Т-ЛИМФОЦИТОВ НА РАЗНЫХ СТАДИЯХ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ У ПАЦИЕНТОВ С ЧЕРЕПНО-МОЗГОВОЙ ТРАВМОЙ, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 2. RELATIVE NUMBER OF REGULATORY T CELL SUBSETS IN PERIPHERAL BLOOD FROM PATIENTS WITH TRAUMATIC BRAIN INJURY, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

Популяция Treg Treg population	Фенотип Phenotype	Группа 1 Group 1	Группа 2 Group 2	Группа 3 Group 3	Группа 4 Group 4	Группа 5 Group 5	р	
CD39-позитивные регуляторные Т-лимфоциты CD39-positive regulatory T cells								
«Наивные» Treg "Naive" Treg	CD45RO ⁺ CD62L ⁺	%	0,6 (0,2-1,3)	0,2 (0,02-0,40)	0,2 (0,01-0,70)	0,09 (0,01-0,30)	0,7 (0,2-1,2)	p ₁₋₃ = 0,027 p ₁₋₄ = 0,0433 p ₂₋₅ = 0,015 p ₃₋₅ = 0,027 p ₄₋₅ = 0,0006
Treg центральной памяти Central memory Treg	CD45RO ⁺ CD62L ⁺	%	1,7 (0,3-1,7)	1,6 (0,8-1,6)	1,0 (0,3-1,9)	0,7 (0,5-2,3)	1,9 (0,5-2,7)	
Treg эффекторной памяти Effector memory Treg	CD45RO ⁺ CD62L ⁻	%	57,9 (53,8-65,0)	61,1 (49,0-76,0)	63,3 (63,0-81,6)	61,7 (53,5-73,4)	55,5 (47,7-59,6)	
CD73-позитивные регуляторные Т-лимфоциты CD73-positive regulatory T cells								
«Наивные» Treg "Naive" Treg	CD45RO ⁺ CD62L ⁺	%	2,6 (1,3-6,2)	2,4 (0,9-6,1)	1,3 (0,2-3,7)	1,5 (0,002-5,100)	4,2 (2,6-5,5)	p ₃₋₅ = 0,002 p ₄₋₅ = 0,048
Treg центральной памяти Central memory Treg	CD45RO ⁺ CD62L ⁺	%	1,7 (0,8-3,6)	2,2 (0,9-3,0)	2,0 (0,7-4,7)	3,4 (1,1-5,6)	2,3 (1,4-3,9)	
Treg эффекторной памяти Effector memory Treg	CD45RO ⁺ CD62L ⁻	%	3,9 (1,6-6,8)	3,4 (1,3-4,7)	2,3 (0,6-5,3)	1,8 (0,9-5,4)	2,5 (1,6-4,2)	

Примечание. % – процент содержания среди субпопуляций регуляторных Т-лимфоцитов: «наивные» Treg (CD45RO⁺CD62L⁺), Treg центральной памяти (CD45RO⁺CD62L⁺) и Treg эффекторной памяти (CD45RO⁺CD62L⁻); группа 1 – сотрясение головного мозга; группа 2 – ушиб легкой степени тяжести; группа 3 – ушиб средней степени тяжести; группа 4 – ушиб тяжелой степени тяжести; группа 5 – контрольная группа.

Note. % Tregs out of total lymphocyte count: naive Tregs (CD45RO⁺CD62L⁺), central memory Tregs (CD45RO⁺CD62L⁺), effector memory Tregs (CD45RO⁺CD62L⁻); group 1 – concussion; group 2 – mild brain contusion; group 3 – moderate brain contusion; group 4 – severe brain contusion; group 5 – control group.

Заключение

Повышенный уровень CD39-позитивных лимфоцитов у пациентов с ушибом головного различной степени тяжести связан с механизмами иммуносупрессии за счет их способности к миграции в воспаленную ткань и последующим

синтезом противовоспалительного аденозина, оказывающего супрессивное действие на клетки врожденного (в т. ч. активированной микроглии) и адаптивного иммунитета, что важно для ограничения процессов, направленных на вторичное повреждение ткани.

Список литературы / References

1. Байдун Л.А., Зурочка А.В., Хайдуков С.В., Тотолян Арег А. Стандартизованная технология «Исследование субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови с применением точных цитофлуориметров-анализаторов» (проект) // Медицинская иммунология, 2012. Т. 14, № 3. С. 255-268. [Baidun L.A., Zurochka A.V., Khaidukov S.V., Totolian Areg A. Methods. Standardized technology "Study of the subpopulation composition of peripheral blood lymphocytes using flow cytometer-analyzers" (draft). *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2012, Vol. 14, no. 3. pp. 255-268. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2012-3-255-268.

2. Кудрявцев И.В., Субботовская А.И. Опыт измерения параметров иммунного статуса с использованием шестицветного цитофлуориметрического анализа // Медицинская иммунология, 2015. Т. 17, № 1.

C. 19-26. [Kudryavtsev I. V., Subbotovskaya A.I. Application of six-color flow cytometric analysis for immune profile monitoring. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2015, Vol. 17, no. 1, pp. 19-26. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2015-1-19-26.

3. Лихтерман Л.Б. Черепно-мозговая травма. Диагностика и лечение. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2014. 488 с. [Likhтерman L.B. Traumatic brain injury. Diagnosis and treatment]. Moscow. GEOTAR-Media, 2014. 488 pp.

4. Сабиров Д.М., Росстальная А.Л., Махмудов М.А. Эпидемиологические особенности черепно-мозгового травматизма // Вестник экстренной медицины, 2019. № 2. С. 61-65. [Sabirov D.M., Rosstalnaya A.L., Makhmudov M.A. Epidemiological features of craniocerebral traumatism. *Vestnik ekstreynoy meditsiny = Bulletin of Emergency Medicine*, 2019, no. 2, pp. 61-65. (In Russ.)]

5. Dantzer R., O'Connor J.C., Freund G.G., Johnson R.W., Kelley K.W. From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. *Nat. Rev. Neurosci.*, 2008, Vol. 9, no. 1, pp. 46-56. doi: 10.1038/nrn2297.

6. Erickson M.A., Wilson M.L. *In vitro* modeling of blood-brain barrier and interface functions in neuroimmune communication. *Fluids Barriers CNS*, 2020, Vol. 17, no. 1, 26. doi: 10.1186/s12987-020-00187-3.

7. Langeh U.U., Singh S. Targeting S100B protein as a surrogate biomarker and its role in various neurological disorders. *Curr. Neuropharmacol.*, 2021, Vol. 9, no. 2, pp. 265-277.

8. Nizamutdinov D., Shapiro L.A. Overview of traumatic brain injury: an immunological context overview of traumatic brain injury: an immunological context. *Brain Sci.*, 2017, Vol. 7, no. 1, 11. doi: 10.3390/brainsci7010011.

9. Peeters W.R., van den Brande R., Polinder S. Epidemiology of traumatic brain injury in Europe. *Acta Neurochir. (Wien)*, 2015, Vol. 157, no. 10, pp. 1683-1696.

Авторы:

Норка А.О. — старший лаборант кафедры иммунологии ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова»; врач-невролог медицинского центра ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера», Санкт-Петербург, Россия

Воробьев С.В. — д.м.н., главный научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории неврологии и нейрореабилитации ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Кузнецова Р.Н. — к.м.н., доцент кафедры иммунологии ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова»; врач — аллерголог-иммунолог медицинского центра ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера», Санкт-Петербург, Россия

Серебрякова М.К. — аспирант, научный сотрудник отдела иммунологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

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

Коваленко С.Н. — преподаватель кафедры нейрохирургии ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова», Санкт-Петербург, Россия

Монашенко Д.Н. — к.м.н., врач-нейрохирург, заведующий 1 НХО СПб ГБУЗ «Городская больница № 26», Санкт-Петербург, Россия

Authors:

Norka A.O., Senior Laboratory Assistant, Department of Immunology, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University; Neurologist, Medical Centre, St. Petersburg Pasteur Research Institute of Epidemiology and Microbiology, St. Petersburg, Russian Federation

Vorobyev S.V., PhD, MD (Medicine), Chief Research Associate, Research Laboratory of Neurology and Neurorehabilitation, V. Almazov National Medical Research Centre, St. Petersburg, Russian Federation

Kuznetsova R.N., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Immunology, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University; Allergist-Immunologist, Medical Centre, St. Petersburg Pasteur Research Institute of Epidemiology and Microbiology, St. Petersburg, Russian Federation

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

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

Kovalenko S.N., Lecturer, Department of Neurosurgery, S. Kirov Military Medical Academy, St. Petersburg, Russian Federation

Monashenko D.N., PhD (Medicine), Neurosurgeon, St. Petersburg City Hospital No. 26, St. Petersburg, Russian Federation

Поступила 10.07.2023

Принята к печати 12.07.2023

Received 10.07.2023

Accepted 12.07.2023

ЭКСПРЕССИЯ ЦИТОКИНОВ ЛЕЙКОЦИТАМИ В АССОЦИИ С ТЯЖЕСТЬЮ АУТИЗМА У ДЕТЕЙ

Филиппова Ю.Ю., Алексеева А.С., Бурмистрова А.Л.

ФГБОУ ВО «Челябинский государственный университет», г. Челябинск, Россия

Резюме. Расстройства аутистического спектра (РАС) – это сложные нарушения развития нервной системы с неизвестной этиологией, высокой клинической гетерогенностью и выраженными аберрациями иммунной системы. Доказательства связи между иммунной дисфункцией и поведенческими чертами подчеркивают необходимость детального изучения функциональной активности популяций иммунных клеток для поиска механизмов патогенеза и потенциальных мишеней для терапии при РАС. Целью данного исследования было: определить уровни экспрессии IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-18, IFN γ и TNF α в лейкоцитах периферической крови детей с легкими и тяжелыми симптомами РАС. В исследование был включен 81 ребенок с РАС (77,8% мальчиков) и 45 детей с типичным нейроразвитием (ТРД, 71,1% мальчиков). По шкале оценки детского аутизма 51 ребенок (63,0%) имел легкие симптомы аутизма (средний балл CARS 32,0 \pm 1,5) и 30 детей – тяжелые симптомы РАС (средний балл CARS 39,0 \pm 3,4). Экспрессию цитокинов в лейкоцитах периферической крови определяли с помощью количественной полимеразной цепной реакции с SYBRGreen. В ходе статистического анализа для приведения данных к нормальному распределению, показатели трансформировали по Боксу–Коксу. Значимость различий между группами оценивали в ходе однофакторного дисперсионного анализа с апостериорными попарными сравнениями методом Данна. Установлено, что в лейкоцитах детей с РАС, не зависимо от тяжести состояния (легкое/тяжелое течение), значимо снижена экспрессия провоспалительных цитокинов – IL-1 β , IL-18 и IL-2, по сравнению с аналогичными показателями ТРД. У детей с легким течением РАС обнаружена низкая экспрессия TNF α , по сравнению с ТРД. У детей с тяжелым течением РАС значимо повышены уровни экспрессии IFN γ – основного цитокина Th1-лимфоцитов, без повышения экспрессии важного цитокина Treg-лимфоцитов – IL-10. Активация Th1 адаптивного иммунного ответа без компенсации цитокинами Treg-лимфоцитов, численность которых снижена при РАС, может приводить к усилению воспаления, в том числе в ЦНС, и коррелирует с тяжестью клинических симптомов РАС. Несмотря на обширные данные, свидетельствующие об дисрегуляции иммунной системы, необходимы дальнейшие исследования для выявления взаимосвязи между функционированием клеток иммунной системы и патобиологией РАС.

Ключевые слова: цитокины, лейкоциты, экспрессия, расстройства аутистического спектра, дети, иммунная дисфункция

Адрес для переписки:

Филиппова Юлия Юрьевна
ФГБОУ ВО «Челябинский государственный
университет»
454001, Россия, г. Челябинск,
ул. Братьев Кашириных, 129.
Тел.: 8 (912) 404-52-72.
E-mail: julse@rambler.ru

Address for correspondence:

Yuliya Yu. Filippova
Chelyabinsk State University
129 Bratiev Kashirinykh St
Chelyabinsk
454001 Russian Federation
Phone: +7 (912) 404-52-72.
E-mail: julse@rambler.ru

Образец цитирования:

Ю.Ю. Филиппова, А.С. Алексеева, А.Л. Бурмистрова
«Экспрессия цитокинов лейкоцитами в ассоциации
с тяжестью аутизма у детей» // Российский
иммунологический журнал, 2023. Т. 26, № 4. С. 593-598.
doi: 10.46235/1028-7221-13911-LCE

© Филиппова Ю.Ю. и соавт., 2023
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

Yu. Yu. Filippova, A. S. Alekseeva, A. L. Burmistrova
“Leukocyte cytokine expression is associated with severity
of autism in children”, Russian Journal of Immunology/
Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2023, Vol. 26, no. 4,
pp. 593-598.
doi: 10.46235/1028-7221-13911-LCE

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

DOI: 10.46235/1028-7221-13911-LCE

LEUKOCYTE CYTOKINE EXPRESSION IS ASSOCIATED WITH SEVERITY OF AUTISM IN CHILDREN

Filippova Yu.Yu., Alekseeva A.S., Burmistrova A.L.

Chelyabinsk State University, Chelyabinsk, Russian Federation

Abstract. Autism Spectrum Disorder (ASD) is a complex neurodevelopmental disorder with unknown etiology, high clinical heterogeneity and marked aberrations of the immune system. Evidence for an association between immune dysfunction and behavioral traits highlights the need for a study of the immune cell functional activity in order to search for pathogenesis mechanisms and potential targets for therapy at ASD. The purpose: to determine the expression levels of IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-18, IFN γ and TNF α in peripheral blood leukocytes of children with mild and severe ASD. The study included 81 children with ASD (77.8% boys) and 45 children with typical neurodevelopment (TDC, 71.1% boys). According to the Childhood Autism Rating Scale, 51 children (63.0%) had mild autistic symptoms (CARS score 32.0 \pm 1,5) and 30 children had severe ASD symptoms (CARS score 39.0 \pm 3,4). Cytokines expression in leukocytes was determined by quantitative PCR with SYBRGreen. The data were transformed using Box–Cox transformation. The differences between groups were assessed by one-way ANOVA and Dunn’s test for multiple comparisons. In leukocytes of children with ASD, regardless of the severity, the expression of IL-1 β , IL-18 and IL-2, was significantly reduced compared to TDC. Moreover, in children with mild ASD, low expression of TNF α , compared with TDC was found. In children with severe ASD, the expression of the main cytokine of Th1 – IFN γ , was significantly increased, without an increased expression of an important cytokine of Treg – IL-10. Activation of the Th1 adaptive immune response without compensation by cytokines of Treg, the number of which is reduced in ASD, can lead to increased inflammation, even in the central nervous system, and correlates with the severity of ASD clinical symptoms. Despite extensive immunological evidence suggesting immune system dysregulation, further research is required to clarify the relationship between immune system cell function and ASD pathology.

Keywords: cytokines, leukocytes, expression, autism spectrum disorders, children, immune dysfunction

Введение

Расстройства аутистического спектра (РАС) – это сложные нарушения развития нервной системы с неизвестной этиологией, высокой клинической гетерогенностью и выраженными aberrациями иммунной системы [6].

В течение нескольких десятилетий исследования в популяциях людей и на животных моделях продемонстрировали доказательства нарушений в функционировании врожденной и адаптивной иммунной систем при РАС, включая активацию иммунных клеток, продукцию аутоантител, дисбаланс цитокинов и хемокинов как в мозге, так и на периферии [10]. Согласно теории материнской иммунной активации (МИА), инфекции и некоторые эпигенетические процессы могут вызывать сильный провоспалительный ответ матери во время беременности, что потенциально увеличивает риск развития РАС у плода [7]. Более того, авторами было показано, что повышенная активация Th1-лимфоцитов и нарушение балан-

са Т-эффекторных/Т-регуляторных клеток связана с более выраженными поведенческими нарушениями при РАС [5, 6]. Доказательства связи между иммунной дисфункцией и поведенческими чертами подчеркивают необходимость дальнейшего изучения функциональной активности популяций иммунных клеток, для поиска механизмов патогенеза и потенциальных мишеней для терапии при РАС [8].

Цель исследования – определить уровни экспрессии IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-18, IFN γ и TNF α в лейкоцитах периферической крови детей с легким и тяжелым течением РАС.

Материалы и методы

Набор детей с РАС проводили в МБУ СО социально-реабилитационный центр «Здоровье» г. Челябинск. Критериями включения в группу РАС были: диагнозы по МКБ-10: F84.0 – Ранний детский аутизм, F84.1 – Атипичный аутизм и F83,1 – Задержка психоречевого развития с

аутистически подобным поведением; отсутствие выявленных генетических нарушений и тяжелых соматических патологий; отсутствие аллергических реакций и острых респираторно-вирусных инфекций на момент обследования. При оценке тяжести состояния на основе рейтинговой шкалы оценки детского аутизма (CARS) из 81 человека (77,8% мальчиков) в возрасте 3-14 лет (медианный возраст 6,0 лет), 51 ребенок (63,0%) имел легкие симптомы аутизма (средний балл CARS $32,0 \pm 1,5$) и 30 детей (37,0%) – тяжелые симптомы РАС (средний балл CARS $39,0 \pm 3,4$).

Контрольную группу составили 45 детей (71,1% мальчиков) с типичным нейроразвитием (ТРД) в возрасте 4-13 лет (медианный возраст 9,0 лет), не имеющих тяжелых соматических заболеваний и психопатологий; с отсутствием аллергических реакций и острых респираторно-вирусных инфекций на момент обследования. Группы были сопоставимы по полу, но возраст ТРД был значимо выше, чем у детей с РАС. Набор в исследование осуществлялся после подписания родителями или законными представителями детей информированного согласия.

В качестве материала для исследования использовали 4 мл венозной крови, собранной после ночного голодания между 08:00–09:00 часами утра в пробирки с консервантом K_3 ЭДТА. Получение фракции лейкоцитов из цельной крови, выделение общей РНК, оценку ее количества и качества осуществляли стандартными методами, как описано ранее [1]. Уровень экспрессии мРНК цитокинов: IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-18 IFN γ и TNF α определяли методом ПЦР в реальном времени с использованием реактивов для количественной ПЦР с SYBRGreen («Синтол», Москва) на приборе ДТ-прайм («ДНК-диагностика», Москва). Программа для амплификации, а также праймеры для мРНК цитокинов и гена домашнего хозяйства (GAPDH) были взяты из статьи Plotnikova и соавт. [9]. Относительные уровни экспрессии генов цитокинов рассчитывали с использованием метода прямого сравнения результатов реакции для целевого и контрольного генов: 2- $\Delta\Delta$ CT.

В ходе статистического анализа для приведения данных к нормальному распределению, показатели трансформировали по Боксу–Коксу. Для вычисления среднего значения и 95% доверительного интервала (ДИ) проводили наивную ретрансформацию. Значимость различий между группами оценивали в ходе однофакторного дисперсионного анализа (one-way ANOVA) с апостериорными попарными сравнениями методом Данна. Двумерные корреляции между

уровнями экспрессии цитокинов в лейкоцитах периферической крови и концентрацией цитокинов в плазме крови оценивали с помощью коэффициента ранговой корреляции Спирмена. Различия считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$. Все расчеты выполнены в программе PAST v. 4.09.

Результаты и обсуждение

Хотя РАС не являются классическими иммуноопосредованными расстройствами, данные литературы убедительно свидетельствуют о нарушении двунаправленных взаимодействий между иммунной и центральной нервной системами (ЦНС) при РАС, что приводит к хроническому слабовыраженному воспалению, как в ЦНС, так и на периферии [3]. Ранее нами также было показано, что дети с тяжелым течением РАС (согласно CARS) демонстрировали высокие уровни IFN γ и IL-6 в плазме крови, что может отражать наличие у них системного хронического низкоуровневого воспаления [2].

В настоящем исследовании нами предпринята попытка оценить влияние воспалительного окружения на цитокиновую функцию лейкоцитов периферической крови или их возможный вклад в системный воспалительный потенциал у детей, в зависимости от наличия/отсутствия РАС и его тяжести.

Профили экспрессии мРНК цитокинов: IL-6, IL-1 β , IL-18, IL-2, TNF α , IFN γ , IL-4 и IL-10, в лейкоцитах периферической крови детей с РАС и ТРД представлены в таблице 1.

Оценка зависимости между уровнями экспрессии цитокинов в лейкоцитах и их концентрацией в плазме у всех обследованных групп детей показала, что уровни экспрессии IL-6 ($r = 0,205$; $p = 0,021$), IFN γ ($r = 0,175$; $p = 0,044$), IL-1 β ($r = 0,195$; $p = 0,028$) и IL-4 ($r = 0,369$; $p = 0,012$) имеют значимые корреляции между плазмой и лейкоцитами. Такие результаты, как продемонстрировано Kutuk M.O. и соавт. [4], могут, вероятно, говорить о вкладе лейкоцитов в системный воспалительный потенциал.

При анализе уровней экспрессии установлено, что в лейкоцитах детей с РАС, не зависимо от тяжести состояния (легкое/тяжелое течение), значимо снижена экспрессия провоспалительных цитокинов – IL-1 β , IL-18 и IL-2, по сравнению с аналогичными показателями ТРД. Кроме того, у детей с легким течением РАС обнаружена низкая экспрессия TNF α по сравнению с ТРД (табл. 1).

ТАБЛИЦА 1. ЭКСПРЕССИЯ ЦИТОКИНОВ ЛЕЙКОЦИТАМИ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ДЕТЕЙ С РАЗНОЙ СТЕПЕНЬЮ ТЯЖЕСТИ РАССТРОЙСТВ АУТИСТИЧЕСКОГО СПЕКТРА, М (95% ДИ)

TABLE 1. PERIPHERAL BLOOD LEUKOCYTES CYTOKINE EXPRESSION WITH DIFFERENT SEVERITY AUTISM SPECTRUM DISORDERS AT CHILDREN, M (95% CI)

Показатель, у. е. Indicator, c. u.	ТРД TDC (n = 45)	Легкое течение РАС Mild ASD (n = 51)	Тяжелое течение РАС Severity ASD (n = 30)	one-way ANOVA	
				F (df ₁ -df ₂)	p
IL-6	5,05 (3,06-8,23)	7,80 (5,06-11,45)	9,28 (4,91-15,99)	0,525 (2-123)	0,593
IL-1β	5,35 (3,35-8,35)	2,15* (1,41-3,16)	2,13* (1,37-3,15)	8,259 (2-123)	< 0,001
IL-18	0,04 (0,02-0,09)	0,01* (0,006-0,020)	0,01* (0,005-0,030)	4,354 (2-123)	0,015
TNFα	0,66 (0,49-0,89)	0,40* (0,30-0,54)	0,51 (0,36-0,74)	3,087 (2-123)	0,049
IFNγ	11,55 (7,24-17,23)	18,80 (13,14-25,34)	31,51* ** (23,32-40,86)	8,01 (2-123)	< 0,001
IL-2	6,46 (4,70-8,56)	3,03* (2,19-4,29)	3,08* (1,98-4,60)	3,419 (2-123)	0,036
IL-4	1,40 (1,10-1,79)	1,28 (0,96-1,68)	1,19 (0,83-1,75)	0,645 (2-123)	0,527
IL-10	11,23 (9,09-13,68)	9,00 (7,41-10,76)	11,35 (8,46-14,82)	1,963 (2-123)	0,145

Примечание. ТРД – дети с типичным нейроразвитием, РАС – расстройства аутистического спектра; * – значимые различия между показателями ТРД и детей с РАС ($p \leq 0,05$); ** – значимые различия между показателями детей с легким и тяжелым течением аутизма ($p \leq 0,05$).

Note. TDC, typical neurodevelopment children; ASD, autism spectrum disorders; *, significant differences between the indicators of TDC and children with ASD ($p \leq 0.05$); **, significant differences between the indicators of children with mild and severe autism ($p \leq 0.05$).

Тяжесть симптомов по шкале CARS у детей с РАС нашла отражение только в уровнях экспрессии IFNγ, которые в лейкоцитах периферической крови детей с тяжелым течением РАС были значимо повышены, как по сравнению с ТРД, так и по сравнению с детьми с легким течением РАС (табл. 1). В уровнях экспрессии IL-4, IL-6, и IL-10 значимых различий между группами не обнаружено (табл. 1).

При дополнительной оценке влияния возраста на экспрессию цитокинов лейкоцитами в каждой группе детей (согласно классификации ВОЗ: до 6 лет, 7-12 и > 13 лет) значимых разли-

чий не обнаружено, что согласуется с данными Kutuk M.O. и соавт. [4].

Заключение

Таким образом, полученные нами данные могут свидетельствовать о значительной дисрегуляции цитокиновой функции лейкоцитов периферической крови у детей с РАС, которая имеет выраженные отличия в зависимости от тяжести симптомов РАС и, вероятно, может быть отражением наличия/отсутствия воспалительного потенциала на периферии.

Так, у детей с легким течением РАС, нами не обнаружено повышения уровней провоспалительных цитокинов в плазме крови, что, видимо, поддерживается низкими уровнями экспрессии основных провоспалительных цитокинов: IL-1 β , IL-18, TNF α и IL-2 в лейкоцитах.

У детей с тяжелым течением РАС, напротив, показано системное низкоуровневое воспаление, которое обусловлено, прежде всего, высокими концентрациями в плазме крови IFN γ и IL-6, на фоне низких значений противовоспалительного цитокина – IL-10. Профиль экспрессии цитокинов лейкоцитами детей с тяжелым течением РАС продемонстрировал высокие уровни IFN γ – основного цитокина Th1-лимфоцитов, на фоне низких значений экспрессии провоспалительных цитокинов: IL-1 β , IL-18 и IL-2, без повышения экспрессии важного цитокина Treg-лимфоцитов – IL-10. Согласно данным литературы, активация Th1 адаптивного иммунного ответа без компенсации цитокинами Treg-лимфоцитов, численность которых снижена при

РАС, может приводить к усилению воспаления, в том числе в ЦНС, и коррелирует с тяжестью клинических симптомов РАС [5, 6]. Кроме Th1-лимфоцитов, продуцентами IFN γ могут выступать естественные киллеры, численность которых по данным Nie Z.K. и соавт. также повышена у детей с РАС [8].

Высокие концентрации IL-6 в плазме крови детей с тяжелым течением РАС могут быть ассоциированы не только с экспрессией данного цитокина лейкоцитами периферической крови (уровни экспрессии которого не имеют значимых различий между группами), но и его продукцией другими клетками организма, прежде всего, эндотелием сосудов.

Несмотря на обширные данные, свидетельствующие о дисрегуляции иммунной системы, необходимы дальнейшие исследования, для выявления взаимосвязи между функционированием популяций иммунных клеток и патобиологией РАС [4].

Список литературы / References

1. Бурмистрова А.Л., Алексеева А.С., Казо М.Е., Филиппова Ю.Ю. Лейкоцитарная сигнатура микроРНК в контексте хронического системного воспаления при сосудистой деменции // Российский иммунологический журнал, 2022. Т. 25, № 4. С. 399-404. [Burmistrova A.L., Alekseeva A.S., Cazaux M.E., Filippova Yu.Yu. MicroRNA signature of leukocytes in the context of chronic systemic inflammation in vascular dementia. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2022, Vol. 25, no. 4, pp. 399-404. (In Russ.)] doi: 10.46235/1028-7221-1187-MSO.
2. Филиппова Ю.Ю., Девятова Е.В., Алексеева А.С., Бурмистрова А.Л. Цитокины и нейротрофические факторы в оценке степени тяжести аутизма у детей // Клиническая лабораторная диагностика, 2022. Т. 67, № 11. С. 647-651. [Filippova Yu.Yu., Devyatova E.V., Alekseeva A.S., Burmistrova A.L. Cytokines and neurotrophic factors in assessing the severity of autism in children. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika = Russian Clinical Laboratory Diagnostics*, 2022, Vol. 67, no. 11, pp. 647-651. (In Russ.)]
3. Dipasquale V., Cutrupi M.C., Colavita L., Manti S., Cuppari C., Salpietro C. Neuroinflammation in autism spectrum disorders: role of high mobility group box 1 protein. *Int. J. Mol. Cell. Med.*, 2017, Vol. 6, no. 3, pp. 148-155.
4. Kutuk M.O., Tufan E., Gokcen C., Kilicaslan F., Karadag M., Mutluer T., Yektas C., Coban N., Kandemir H., Buber A., Coskun S., Acikbas U., Guler G., Topal Z., Celik F., Altintas E., Giray A., Aka Y., Kutuk O. Cytokine expression profiles in Autism spectrum disorder: A multi-center study from Turkey. *Cytokine*, 2020, Vol. 133, 155152. doi: 10.1016/j.cyto.2020.155152.
5. Li X., Chauhan A., Sheikh A.M., Patil S., Chauhan V., Li X.M., Ji L., Brown T., Malik M. Elevated immune response in the brain of autistic patients. *J. Neuroimmunol.*, 2009, Vol. 207, pp. 111-116.
6. Masi A., Glozier N., Dale R., Guastella A.J. The immune system, cytokines, and biomarkers in autism spectrum disorder. *Neurosci. Bull.*, 2017, Vol. 33, no. 2, pp. 194-204.
7. Meltzer A., van de Water J. The role of the immune system in autism spectrum disorder. *Neuropsychopharmacology*, 2017, Vol. 42, no. 1, pp. 284-298.
8. Nie Z.Q., Han D., Zhang K., Li M., Kwon H.K., Im S.H., Xu L., Yang J., Li Z.W., Huang X.W., Wen J., Shu-Jun Y., Yin F., Shen C., Ashwood P., Kang C.Y., Cao X. TH1/Treg ratio may be a marker of autism in children with immune dysfunction. *Research in Autism Spectrum Disorders*, 2023, Vol. 101, 102085. doi: 10.1016/j.rasd.2022.102085.

9. Plotnikova M.A., Klotchenko S.A., Vasin A.V. Development of a multiplex quantitative PCR assay for the analysis of human cytokine gene expression in influenza A virus-infected cells. *J. Immunol. Methods*, 2016, Vol. 430, pp. 51-55.

10. Singh R., Kisku A., Kungumaraj H., Nagaraj V., Pal A., Kumar S., Sulakhiya K. Autism spectrum disorders: a recent update on targeting inflammatory pathways with natural anti-inflammatory agents. *Biomedicines*, 2023, Vol. 11, no. 1, 115. doi: 10.3390/biomedicines11010115.

Авторы:

Филиппова Ю.Ю. — д.б.н., доцент кафедры микробиологии, иммунологии и общей биологии биологического факультета ФГБОУ ВО «Челябинский государственный университет», г. Челябинск, Россия

Алексеева А.С. — аспирант кафедры микробиологии, иммунологии и общей биологии биологического факультета ФГБОУ ВО «Челябинский государственный университет», г. Челябинск, Россия

Бурмистрова А.Л. — д.м.н., профессор, заведующая кафедрой микробиологии, иммунологии и общей биологии биологического факультета ФГБОУ ВО «Челябинский государственный университет», г. Челябинск, Россия

Authors:

Filippova Yu. Yu., PhD (Biology), Associate Professor, Department of Microbiology, Immunology and General biology, Faculty of Biology, Chelyabinsk State University, Chelyabinsk, Russian Federation

Alekseeva A. S., Postgraduate Student, Department of Microbiology, Immunology and General Biology, Faculty of Biology, Chelyabinsk State University, Chelyabinsk, Russian Federation

Burmistrova A. L., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Microbiology, Immunology and General Biology, Faculty of Biology, Chelyabinsk State University, Chelyabinsk, Russian Federation

Поступила 10.07.2023
Принята к печати 12.07.2023

Received 10.07.2023
Accepted 12.07.2023

ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ И БИОХИМИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ НЕБЛАГОПРИЯТНОГО ИСХОДА ЗАБОЛЕВАНИЯ ПРИ COVID-19 И АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИИ

Мордык А.В.^{1, 2}, Багишева Н.В.¹, Моисеева М.В.¹, Антипова Е.П.¹,
Стрельцова В.В.¹

¹ ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ,
г. Омск, Россия

² ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр фтизиопульмонологии и инфекционных
заболеваний» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Резюме. Коронавирус способен оказывать действие на различные органы и системы, не является исключением и иммунная система. При этом состояние иммунной системы может изначально меняться у пациентов с имеющейся коморбидной неинфекционной нозологией.

Целью настоящего исследования было изучение биохимических и иммунологических маркеров неблагоприятного исхода при коронавирусной инфекции у пациентов с артериальной гипертензией.

В ретроспективное исследование включено 47 пациентов с COVID-19 и артериальной гипертензией, которым было проведено исследование С-реактивного белка (СРБ) интерлейкина-6 (IL-6) с оценкой уровня повышения маркеров и исхода заболевания. Из них мужчин 23, женщин 24, медиана возраста мужчин 54, женщин 57 лет.

У пациентов с COVID-19 и артериальной гипертензией (АГ), госпитализированных в стационар, наблюдается параллельное увеличение и СРБ и IL-6. Выявлены статистически значимые различия по уровням СРБ и IL-6 у пациентов с благоприятным и неблагоприятным исходом, уровень СРБ и IL-6 у умерших пациентов был выше и не имел тенденции к снижению. Таким образом, одновременное увеличение СРБ и IL-6 у пациентов с COVID-19 и АГ является неблагоприятным прогностическим параметром в отношении выживаемости больных.

Ключевые слова: коронавирусная инфекция, артериальная гипертензия, С-реактивный белок, IL-6, исход лечения

Адрес для переписки:

Мордык Анна Владимировна
ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский
университет» Министерства здравоохранения РФ
644099, Россия, г. Омск, ул. Ленина, 12.
Тел.: 8 (906) 235-38-55.
E-mail: amordik@mail.ru

Address for correspondence:

Anna V. Mordyk
Omsk State Medical University
12 Lenina St
Omsk
644099 Russian Federation
Phone: +7 (906) 235-38-55.
E-mail: amordik@mail.ru

Образец цитирования:

А.В. Мордык, Н.В. Багишева, М.В. Моисеева,
Е.П. Антипова, В.В. Стрельцова «Иммунологические
и биохимические маркеры неблагоприятного
исхода заболевания при COVID-19 и артериальной
гипертензии» // Российский иммунологический журнал,
2023. Т. 26, № 4. С. 599-602.
doi: 10.46235/1028-7221-13945-IAB
© Мордык А.В. и соавт., 2023
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

A.V. Mordyk, N.V. Bagisheva, M.V. Moiseeva, E.P. Antipova,
V.V. Streltsova "Immunological and biochemical markers
of adverse outcome in COVID-19 and arterial hypertension",
Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii
Zhurnal, 2023, Vol. 26, no. 4, pp. 599-602.
doi: 10.46235/1028-7221-13945-IAB
© Mordyk A.V. et al., 2023
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.46235/1028-7221-13945-IAB

IMMUNOLOGICAL AND BIOCHEMICAL MARKERS OF ADVERSE OUTCOME IN COVID-19 AND ARTERIAL HYPERTENSION

Mordyk A.V.^{a, b}, Bagisheva N.V.^a, Moiseeva M.V.^a, Antipova E.P.^a, Streltsova V.V.^a

^a Omsk State Medical University, Omsk, Russian Federation

^b National Medical Research Center for Phthisiopulmonology and Infectious Diseases, Moscow, Russian Federation

Abstract. Coronavirus is able to affect various organs and systems including the immune system. At the same time, the state of the immune system may be initially changed in patients with pre-existing comorbid non-infectious disorders. The aim of our study was to evaluate biochemical and immunological markers of adverse outcomes in the patients with new coronavirus infection with underlying arterial hypertension.

The retrospective study included 47 patients with COVID-19 and arterial hypertension, who underwent a study of C-reactive protein (CRP), interleukin-6 (IL-6), assessing the increased values of these markers and the outcomes of the disease. The study group included 23 male and 24 female patients at the median age of 54 (for men), and 57 years old (for women).

Upon admittance of the patients with COVID-19 and hypertension to the hospital, a parallel increase in both CRP and IL-6 was registered in these cases. Statistically significant differences were found in the levels of CRP and IL-6 in patients with a favorable versus unfavorable clinical outcomes. The levels of CRP and IL-6 in deceased patients were higher and did not tend to decrease. Thus, the simultaneous increase in CRP and IL-6 in patients with COVID-19 and hypertension is considered an unfavorable prognostic parameter for patients' survival.

Keywords: coronavirus infection, arterial hypertension, C-reactive protein, IL-6, treatment outcome

Введение

В марте 2020 года Всемирная организация здравоохранения объявила о начале пандемии COVID-19, в мае же 2023 года статус пандемии для COVID-19 был снят. За три года, по данным организации, всего в мире зарегистрировано более 700 млн случаев заражения коронавирусом, из которых более 20 млн стали летальными. Это не означает, что коронавирусная инфекция не нуждается в дальнейшем изучении. Сохраняется риск тяжелого течения заболевания, особенно у пациентов с коморбидной патологией [1, 2, 3]. Хронические заболевания увеличивают риск неблагоприятного исхода заболевания, вплоть до летального. По данным исследований, наибольшее число госпитализаций, тяжелого течения и неблагоприятных исходов коронавирусной инфекции выявлено у пациентов с сопутствующими заболеваниями сердечно-сосудистой системы [6, 7].

Особое внимание в данной ситуации отводится изучению реакции иммунной системы человека на встречу с коронавирусом при сочетании COVID-19 и коморбидной патологии. В частности, речь идет об иммунном воспалении, сопровождающемся повышенным тромбообразованием [3]. Состояние иммунной системы характеризуется большим количеством параметров (С-реактивный белок (СРБ), интерлейкины и т. д.), однако поиск маркеров тяжести для отдельных групп пациентов продолжается. В ряде

исследований изучалась зависимость тяжести течения COVID-19 у пациентов с АГ от уровня иммунологических маркеров, в других исследованиях рассматривалась зависимость исхода заболевания от уровня СРБ и интерлейкинов при моноэтиологии COVID-19 [3, 4, 5, 8, 10], изучение же зависимости уровня маркеров воспаления и исхода заболевания у пациентов с COVID-19 и артериальной гипертензией (АГ) не проводилось, что и определило актуальность представленного исследования.

Цель исследования — изучение биохимических и иммунологических маркеров неблагоприятного исхода при коронавирусной инфекции у пациентов с артериальной гипертензией.

Материалы и методы

В ретроспективное исследование включено 47 пациентов с COVID-19 и артериальной гипертензией (АГ), из них 23 человека мужчин, 24 женщины. Медиана (Me) ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$) возраста мужчин составила 56 (51-59) лет, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$) возраста женщин — 58 (54-61) лет, статистически значимых различий по возрасту среди мужчин и женщин обнаружено не было. Всем пациентам, включенным в исследование, было проведено измерение С-реактивного белка (СРБ), интерлейкина-6 (IL-6) с оценкой уровня повышения данных маркеров. Также оценивалась зависимость динамики данного биохимического и иммунологического

ТАБЛИЦА 1. УРОВНИ СРБ И IL-6 ПРИ ПОСТУПЛЕНИИ У ПАЦИЕНТОВ С COVID-19 И АГ, ГОСПИТАЛИЗИРОВАННЫХ В СТАЦИОНАР

TABLE 1. LEVELS OF CRP AND IL-6 AT ADMISSION IN PATIENTS WITH COVID-19 AND AH ADMITTED TO THE HOSPITAL

Маркеры Markers	Me (Q _{0,25} -Q _{0,75})		Z	p
	Неблагоприятный исход Unfavorable outcome	Благоприятный исход Favorable outcome		
СРБ, мг/л / CRP, mg/L	64 (42-66)	24 (18-36)	-2,37181	0,017702
IL-6, пг/мл / IL-6, pg/mL	83,2 (27,6-141,0)	15,4 (3,5-30,5)	-2,21949	0,026454

Примечание. Z – критерий Манна–Уитни.

Note. Z, Mann–Whitney U test.

ТАБЛИЦА 2. УРОВНИ СРБ И IL-6 В ДИНАМИКЕ (ЧЕРЕЗ 7 ДНЕЙ ПОСЛЕ ГОСПИТАЛИЗАЦИИ) У ПАЦИЕНТОВ С COVID-19 И АГ

TABLE 2. CRP AND IL-6 LEVELS IN DYNAMICS (7 DAYS AFTER HOSPITALIZATION) IN PATIENTS WITH COVID-19 AND AH

Маркеры Markers	Me (Q _{0,25} -Q _{0,75})		Z	p
	Неблагоприятный исход Unfavorable outcome	Благоприятный исход Favorable outcome		
СРБ, мг/л / CRP, mg/L	58 (51-90)	14 (6-25)	-2,84726	0,004410
IL-6, пг/мл / IL-6, pg/mL	128,4 (36,7-182,3)	10,3 (2,4-31,0)	-2,30653	0,021082

Примечание. Z – критерий Манна–Уитни.

Note. Z, Mann–Whitney U test.

маркеров и исход заболевания (жив или умер пациент). Обработка данных произведена в Excel. Статистическая обработка данных была проведена с использованием программы Statistica 8.0: рассчитывали показатели описательной статистики, статистическую значимость различий величин показателей между группами определяли с помощью непараметрического критерия Манна–Уитни (Mann–Whitney U test).

Результаты и обсуждение

У пациентов с COVID-19 и АГ, госпитализированных в стационар, наблюдалось одновременное увеличение и СРБ и IL-6 (табл. 1).

Выявлены статистически значимые различия по уровням СРБ и IL-6 у пациентов с благоприятным и неблагоприятным исходом, уровень СРБ и IL-6 у умерших пациентов был выше, различия между группами статистически значимы (табл. 1).

В различных исследованиях было показано, что у пациентов (n = 1302) с тяжелым течением COVID-19 уровень IL-6 был в 3 раза выше, чем у пациентов с легким/умеренным течением заболевания (p < 0,001) [5]; увеличение концентрации IL-6 ассоциируется с риском летальности [9]; по данным Ruan Q. и соавт., средняя концентрация IL-6 у впоследствии умерших пациентов (11,4±8,5 мг/мл) была достоверно выше, чем у выживших (6,8±3,6 пг/мл; p < 0,001) [8]; по материалам другого метаанализа (9 исследований, 1426 пациентов), средняя концентрация IL-6 у «тяжелых» пациентов с COVID-19 была досто-

верно выше, чем у «не тяжелых» (средняя разница – 38,6 пг/мл; p < 0,001) [3, 4]. Нами получена разница IL-6 в 67,8 пг/мл среди пациентов с благоприятным и неблагоприятным исходом, различия между группами статистически значимы (табл. 2).

У пациентов с неблагоприятным исходом отсутствовала тенденция к снижению изучаемых биохимического (СРБ) и иммунологического (IL-6) маркеров на фоне терапии (табл. 2).

Риск развития тяжелого течения COVID-19 возрастает при уровне IL-6 > 55 пг/мл, а летальности – при его уровне > 80 мг/мл [4]. Нами при госпитализации и в динамике были выявлены высокие значения уровня IL-6 у впоследствии умерших пациентов, различия между группами статистически значимы (табл. 1, 2).

По данным Zhu Z. и соавт. увеличение концентрации IL-6, СРБ и наличие АГ связано с риском тяжелого течения COVID-19 (AUC = 0,900) [10]. В проведенном нами исследовании также у пациентов с впоследствии неблагоприятным исходом были выявлены высокие уровни IL-6, СРБ как при поступлении в стационар, так и в динамике (через 7 дней от момента госпитализации).

Заключение

Одновременное увеличение СРБ и IL-6 у пациентов с COVID-19 и АГ является неблагоприятным прогностическим параметром в отношении выживаемости больных.

Список литературы / References

1. Антипова Е.П., Моисеева М.В., Багишева Н.В., Мордык А.В., Джусоева Е.Г., Стрельцова В.В. COVID-19 в когорте пациентов с артериальной гипертензией: роль рецепторов ангиотензинпревращающего фермента // Забайкальский медицинский вестник, 2023. № 1. С. 104-112. [Antipova E.P., Moiseeva M.V., Bagisheva N.V., Mordyk A.V., Dzhusoeva E.G., Streltsova V.V. COVID-19 in a cohort of patients with arterial hypertension: the role of angiotensin-converting enzyme receptors. *Zabaykalskiy meditsinskiy vestnik = Transbaikalskiy Medical Bulletin*, 2023, no. 1, pp. 104-112. (In Russ.)]
2. Моисеева М.В., Багишева Н.В., Мордык А.В., Джусоева Е.Г., Антипова Е.П., Марченко Е.Д. Что известно о влиянии артериальной гипертензии на течение COVID-19 // Клинический разбор в общей медицине, 2022. № 5. С. 6-9. [Moiseeva M.V., Bagisheva N.V., Mordyk A.V., Dzhusoeva E.G., Antipova E.P., Marchenko E.D. What is known about the effect of arterial hypertension on the course of COVID-19. *Klinicheskiy razbor v obshchey meditsine = Clinical Analysis in General Medicine*, 2022, no. 5, pp. 6-9. (In Russ.)]
3. Насонов Е.Л. Иммунопатология и иммунофармакотерапия коронавирусной болезни 2019. (COVID-19): фокус на интерлейкин 6 // Научно-практическая ревматология, 2020. Т. 58, № 3. С. 245-261. [Nasonov E.L. Immunopathology and immunopharmacotherapy of coronavirus disease 2019. (COVID-19): focus on interleukin 6. *Nauchno-prakticheskaya revmatologiya = Scientific and Practical Rheumatology*, 2020, Vol. 58, no. 3, pp. 245-261. (In Russ.)]
4. Aziz M., Fatima R., Assaly R. Elevated interleukin-6 and severe COVID-19: A meta-analysis. *J. Med. Virol.*, 2020, Vol. 92, no. 11, pp. 2283-2285.
5. Diao B., Wang C., Tan Y., Chen X., Liu Y., Ning L., Chen L., Li M., Liu Y., Wang G., Yuan Z., Feng Z., Zhang Y., Wu Y., Chen Y. Reduction and functional exhaustion of T Cells in patients with coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Front. Immunol.*, 2020, Vol. 11, 827. doi: 10.3389/fimmu.2020.00827.
6. Ruan Q., Yang K., Wang W., Jiang L., Song J. Clinical predictors of mortality due to COVID-19 based on an analysis of data of 150 patients from Wuhan, China. *Intensive Care Med.*, 2020. Vol. 46, no. 5, pp. 846-848.
7. Wu C., Chen X., Cai Y., Xia J., Zhou X., Xu S., Huang H., Zhang L., Zhou X., Du C., Zhang Y., Song J., Wang S., Chao Y., Yang Z., Xu J., Zhou X., Chen D., Xiong W., Xu L., Zhou F., Jiang J., Bai C., Zheng J., Song Y. Risk factors associated with acute respiratory distress syndrome and death in patients with coronavirus disease 2019 pneumonia in Wuhan, China. *JAMA Intern. Med.*, 2020, Vol. 180, no. 7, pp. 934-943.
8. Zhu Z., Cai T., Fan L., Lou K., Hua X., Huang Z., Gao G. Clinical value of immune-inflammatory parameters to assess the severity of coronavirus disease 2019. *Int. J. Infect. Dis.*, 2020. Vol. 96, pp. 332-339.

Авторы:

Мордык А.В. — д.м.н., профессор, заведующая кафедрой фтизиатрии, пульмонологии и инфекционных болезней ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, Омск; профессор Центра образования ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр фтизиопульмонологии и инфекционных заболеваний» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Багишева Н.В. — к.м.н., доцент кафедры поликлинической терапии и внутренних болезней ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Омск, Россия

Моисеева М.В. — к.м.н., доцент кафедры поликлинической терапии и внутренних болезней ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Омск, Россия

Антипова Е.П. — ассистент кафедры фтизиатрии, пульмонологии и инфекционных болезней ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Омск, Россия

Стрельцова В.В. — студентка 6-го курса лечебного факультета ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Омск, Россия

Authors:

Mordyk A.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Phthisiatry, Pulmonology and Infectious Diseases, Omsk State Medical University, Omsk; Professor, Education Center, National Medical Research Center for Phthisiopulmonology and Infectious Diseases, Moscow, Russian Federation

Bagisheva N.V., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Polyclinic Medicine and Internal Diseases, Omsk State Medical University, Omsk, Russian Federation

Moiseeva M.V., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Polyclinic Medicine and Internal Diseases, Omsk State Medical University, Omsk, Russian Federation

Antipova E.P., Assistant Professor, Department of Phthisiatry, Pulmonology and Infectious Diseases, Omsk State Medical University, Omsk, Russian Federation

Streltsova V.V., Student, Faculty of Medicine, Omsk State Medical University, Omsk, Russian Federation

Поступила 10.07.2023
Принята к печати 12.07.2023

Received 10.07.2023
Accepted 12.07.2023

ЭКСПРЕССИЯ И ПРОДУКЦИЯ ЦИТОКИНОВ У ПАЦИЕНТОВ С ТЯЖЕЛЫМ ТЕЧЕНИЕМ SARS-CoV-2

Абрамова Н.Д.¹, Меремьянина Е.А.^{1,2}, Калюжная Н.О.¹,
Поддубиков А.В.¹, Костинов М.П.^{1,3}, Греченко В.В.⁴, Свитич О.А.^{1,3}

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

² ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования», Москва, Россия

³ ФGAOY BO «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ (Сеченовский университет), Москва, Россия

⁴ ФGAOY BO «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Резюме. Многие респираторные вирусные инфекции протекают в легкой форме, включая заболевание COVID-19, однако у некоторых пациентов наблюдается тяжелое системное воспаление, повреждение тканей, острый респираторный дистресс-синдром, а также вызывается цитокиновый шторм, который в дальнейшем может приводить к летальному исходу. Долгое время считалось, что цитокины играют важную роль в иммунопатологии при вирусной инфекции. Однако чрезмерная иммунная реакция в виде массивно выброса провоспалительных цитокинов может вызвать иммунное повреждение организма. В то время как продукция и высвобождение цитокинов у здоровых людей лежит в основе существенного баланса воспалительных и гомеостатических факторов, в случае заболевания COVID-19 часто происходит неконтролируемое усиленное производство цитокинов, имеющее фатальные последствия для организма. Поэтому цель данной работы – изучение уровня экспрессии генов IL-1 β , IL-18 и TNF α , а также продукции этих цитокинов на уровне слизистых оболочек верхних дыхательных путей, в частности в ротовой полости, у пациентов с тяжелым течением заболевания COVID-19.

В настоящее исследование были включены пациенты переболевших тяжелой формой заболевания COVID-19. Контрольную группу составили условно здоровые лица. Уровни экспрессии генов IL-1 β , IL-18 и TNF α определяли с помощью ОТ ПЦР-РВ. Уровни продукции белка IL-1 β , IL-18 и TNF α определяли методом мультиплексного иммуноферментного анализа.

Адрес для переписки:

Абрамова Наталья Дмитриевна
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова»
105064, Россия, Москва, Малый Казенный пер., 5а.
Тел.: 8 (916) 478-64-57.
E-mail: and960911@gmail.com

Address for correspondence:

Natalya D. Abramova
I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera
5a Maly Kazenny Lane
Moscow
105064 Russian Federation
Phone: +7 (916) 478-64-57.
E-mail: and960911@gmail.com

Образец цитирования:

Н.Д. Абрамова, Е.А. Меремьянина, Н.О. Калюжная,
А.В. Поддубиков, М.П. Костинов, В.В. Греченко,
О.А. Свитич «Экспрессия и продукция цитокинов
у пациентов с тяжелым течением SARS-CoV-2»
// Российский иммунологический журнал, 2023. Т. 26,
№ 4. С. 603-610.
doi: 10.46235/1028-7221-13957-CEA

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

For citation:

N.D. Abramova, E.A. Meremyanina, N.O. Kalyuzhnaya,
A.V. Poddubikov, M.P. Kostinov, V.V. Grechenko, O.A. Svitich
“Cytokine expression and production in severe cases
of SARS-CoV-2 infection”, Russian Journal of Immunology/
Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2023, Vol. 26, no. 4,
pp. 603-610. doi: 10.46235/1028-7221-13957-CEA

© Abramova N.D. et al., 2023
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.46235/1028-7221-13957-CEA

Уровни экспрессии IL-1 β , IL-18 были снижены в дебюте заболевания, а также в середине заболевания COVID-19, однако увеличивались на 30-е сутки. Белковая продукция этих цитокинов также была снижена в первые дни от начала заболевания. Уровень провоспалительного цитокина TNF α был высоким в начале заболевания. Уровень продукции TNF α в дебюте заболевания также был выше относительно контрольной группы. В дальнейшем по ходу развития заболевания уровень экспрессии гена TNF α снижался.

Такое повышение уровня экспрессии провоспалительных цитокинов может объясняться тем, что S-белок вируса индуцирует повышенную экспрессию в моноцитах человека, однако уровень белка при этом остается низким, в особенности на 1-е сутки от начала заболевания. Таким образом, можно сделать вывод, что вирус запускает пироптоз, но в течение 15-30 суток от начала заболевания, когда вирусная репликация уже минимальна.

Ключевые слова: IL-1 β , IL-18, TNF α , интерлейкины, экспрессия, заболевание COVID-19, цитокиновый шторм

CYTOKINE EXPRESSION AND PRODUCTION IN SEVERE CASES OF SARS-CoV-2 INFECTION

Abramova N.D.^a, Meremyanina E.A.^{a, b}, Kalyuzhnaya N.O.^a,
Podubikov A.V.^a, Kostinov M.P.^{a, c}, Grechenko V.V.^d, Svitich O.A.^{a, c}

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

^b Russian Medical Academy of Continuous Professional Education, Moscow, Russian Federation

^c I. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation

^d N. Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russian Federation

Abstract. Most respiratory viral infections proceed in mild form including COVID-19. However, some patients experience severe systemic inflammation, tissue damage, acute respiratory distress syndrome, and cytokine storm with potentially lethal outcomes. The cytokines have been thought to play an important role in immunopathology of viral infection. However, an excessive immune response, manifesting as massive release of pro-inflammatory cytokines, may cause immune damage in the body. Production and release of the cytokines in healthy individuals presumes a significant balance of inflammatory and homeostatic factors. Meanwhile, in the case of COVID-19 disease, uncontrolled increased production of cytokines often occurs with fatal consequences for patients. The aim of this work was to study the level of IL-1 β , IL-18 and TNF α gene expression, as well as production of these cytokines at the level of mucous membranes of the upper respiratory tract, in particular in oral cavity, in patients with severe COVID-19 disease.

The present study included patients who recovered from severe COVID-19. The control group consisted of conditionally healthy individuals. Expression levels of the IL-1 β , IL-18, and TNF α genes were determined by RT-PCR. The levels of IL-1 β , IL-18 and TNF α protein production were determined by multiplex enzyme immunoassay.

The expression levels of IL-1 β , IL-18 were reduced at the onset of the disease, as well as in the midpoint of the COVID-19 disease, but increased on the 30th day. The protein production of these cytokines was also reduced in the first days from the onset of the disease. The levels of pro-inflammatory TNF α cytokine was high at the onset of the disease. The level of TNF α production at the onset of the disease was also higher relative to the control group. Subsequently, the TNF α gene expression levels decreased upon progression of the disease.

Thus, the increased expression level of pro-inflammatory cytokines may be explained by the fact that the S protein of the SARS-CoV-2 virus induces increased expression of these cytokines in human monocytes. Meanwhile, appropriate protein levels remain low, especially on day 1 from the onset of the disease. Thus, one may conclude that the virus triggers pyroptosis, however, within 15-30 days from the onset of the disease, when viral replication is already minimal.

Keywords: IL-1 β , IL-18, TNF α , interleukins, expression, COVID-19 disease, cytokine storm

Введение

Заболевание COVID-19, вызванное SARS-CoV-2 инфицировало миллионы людей на планете и продолжает вызывать заболеваемость и смертность во всем мире. Многие респираторные вирусные инфекции протекают в легкой форме, включая заболевание COVID-19, однако у некоторых пациентов наблюдается тяжелое системное воспаление, повреждение тканей, острый респираторный дистресс-синдром, а также вызывается цитокиновый шторм. Долгое время считалось, что цитокины играют важную роль в иммунопатологии при вирусной инфекции. Быстрый и хорошо скоординированный врожденный иммунный ответ является первой линией защиты от вирусной инфекции. Однако нерегулируемые и чрезмерные иммунные реакции могут вызвать иммунное повреждение человеческого организма [3, 4]. В то время как продукция и высвобождение цитокинов у здоровых людей лежат в основе существенного баланса воспалительных и гомеостатических факторов, в случае заболевания COVID-19 часто происходит неконтролируемое перепроизводство цитокинов, имеющее фатальные последствия для организма. В связи с этим повсеместно обсуждаемым термином является феномен цитокинового шторма, который проявляется как гиперактивность клеток иммунной системы, продуцирующих провоспалительные цитокины, и может привести к тяжелым и/или фатальным случаям полиорганной недостаточности [1, 11]. Клеточные эксперименты показывают, что замедленное высвобождение цитокинов и хемокинов происходит в клетках респираторного эпителия, дендритных клетках (ДК) и макрофагах на ранней стадии инфекции SARS-CoV-2. Позже клетки секретируют низкие уровни противовирусных факторов интерферонов (IFN) и высокие уровни провоспалительных цитокинов таких, как интерлейкин IL-1 β , IL-6, IL-18 и TNF α .

Поскольку такой провоспалительный цитокин, как TNF α , является одним из наиболее интенсивно изучаемых цитокинов и, как известно, играет решающую роль во множестве воспалительных заболеваний, TNF α выполняет ключевые функции в поддержании иммунной системы и физиологического гомеостаза. Однако способность TNF α форсировать активацию иммунных клеток может приводить к гипервоспалительной реакции и повреждению тканей при определенных обстоятельствах, как в случае возникно-

вения цитокинового шторма при заболевании COVID-19 [7, 9].

Заболевание COVID-19 традиционно имеет двухфазное течение. Первая фаза характеризуется вирусным ответом, за которым следует фаза гипервоспалительной реакции. Гипервоспалительная реакция обычно возникает примерно через 8-15 дней после появления первых симптомов, когда вирусная репликация ослабевает [6, 10]. Данная гипервоспалительная фаза характеризуется избыточной продукцией воспалительных цитокинов и хемокинов в легких, что приводит к рекрутированию провоспалительных клеток, еще больше усиливая воспаление и вызывая повреждение легких. Известно, что инфламмосомы активируются во время вирусных инфекций в том числе и респираторных, и эти инфламмосомы участвуют в активации цитокинов семейства интерлейкинов IL-1, особенно IL-1 β и IL-18, биологическая активность которых зависит от активности каспазы-1 [2]. Нарушенная активация инфламмосом может быть триггером гипервоспаления, наблюдаемого при тяжелом течении COVID-19.

Такая чрезмерная реакция провоспалительных цитокинов, опосредованных быстрым иммунным ответом, может привести к цитокиновому шторму, который, как известно, отвечает как за критическое состояния, так и за полиорганные повреждения и, следовательно, приводит к высокому риску смертности при заболевании COVID-19. Известно, что у пациентов, с чрезмерной гипервоспалительной реакцией и у них более вероятно развитие синдрома высвобождения цитокинов и острого респираторного дистресс-синдрома (ОРДС), который характеризуется сильной воспалительной реакцией в легочной ткани, отдышкой и даже после выздоровления значительно ухудшает качество жизни.

Поэтому **цель данной работы** изучение экспрессии генов IL-1 β , IL-18 и TNF α , а также их продукцию на уровне слизистых оболочек верхних дыхательных путей у пациентов с тяжелым течением заболевания COVID-19.

Материалы и методы

В настоящее исследование были включены пациенты (n = 20), переболевшие тяжелой формой заболевания COVID-19. Контрольную группу составили (n = 10) условно здоровые пациенты, контактировавшие с инфекцией SARS-CoV-2, но без подтвержденного анализа на SARS-CoV-2. В ра-

боте использовали биоматериал в виде соскобов слизистых оболочек ротоглотки. Забор материала производился цитощеточкой типа А («Юнона», Россия), и он транспортировался в лабораторию в пробирке на 1,5 мл в физиологическом растворе («Панеко», Россия) в закрытом пакете. Всем пациентам с новой коронавирусной инфекцией проводили комплексное клиническое обследование, включавшее компьютерную томографию (КТ) органов грудной клетки, пульсоксиметрию и лабораторные тесты на наличие РНК (антигена) SARS-CoV-2. Исследование проводилось при информированном согласии пациентов.

Из полученного биоматериала выделяли РНК методом сорбции на силикагеле с использованием коммерческого набора «РИБО-сорб» (Amplisense, Россия) в соответствии с протоколом проведения для данного набора. Проверка качества выделенной РНК для исследования экспрессии генов IL-1 β , IL-18 и TNF α осуществлялась с помощью спектрофотометра Nanodrop 2000[®] (Thermo Scientific, США). Реакцию обратной транскрип-

ции и последующую ПЦР-РВ анализ проводили с помощью коммерческих наборов «Набор для обратной транскрипции ОТ-1» «Набор реагентов для проведения ПЦР-РВ в присутствии красителя SYBR Green I» («Синтол», Россия). Последовательность праймеров для генов IL-1 β , IL-18 и TNF α подбирали с помощью программы Vector NTI, анализируя последовательность интересующих генов, полученную из GenBank.

Стандартизация результатов ПЦР-РВ проводилась по уровню экспрессии гена «домашнего хозяйства» β -актина. Обхват экспрессии гена был посчитан методом относительного анализа экспрессии гена с использованием метода $\Delta\Delta C_t$.

Определение уровня цитокинов на уровне слизистых оболочек ротоглотки проводили с использованием флуоресцентного ридера MAGPIX компании Bio-Rad. Для измерения использовался набор реактивов Bio-Plex Pro Human Cytokine Screening Panel компании Bio-Rad. Анализ проводился строго по прилагаемой к набору методике. Полученные данные (концентрации пг/мл)

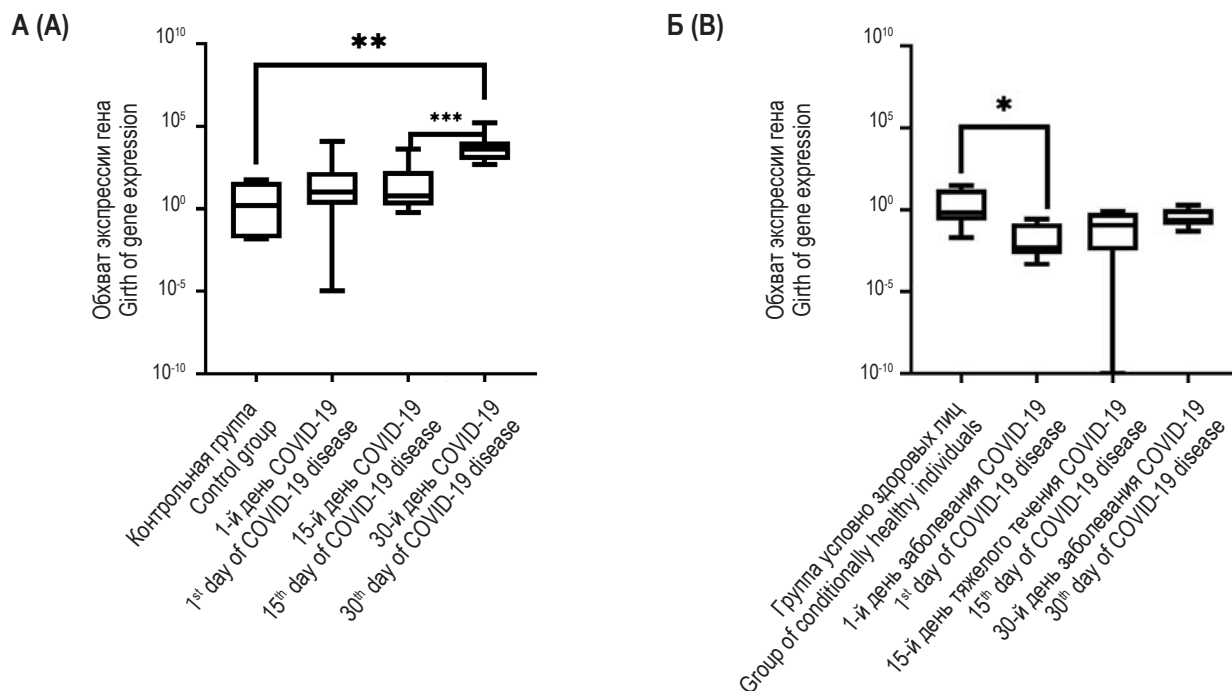


Рисунок 1. Экспрессионный профиль цитокинов IL 1 β , IL-18 на уровне слизистой оболочки ротовой полости
Примечание. А – экспрессия IL-1 β на уровне слизистой оболочки ротовой полости. По оси абсцисс – время и группы. По оси ординат – относительные единицы от числа копий β -актина. $p \leq 0,05$ по тесту Манна–Уитни. Б – экспрессия IL-1 β на уровне слизистой оболочки ротовой полости. По оси абсцисс время и группы. По оси ординат Относительные единицы от числа копий β -актина. * – $p \leq 0,05$ по тесту Манна–Уитни; ** – $0,001 < p \leq 0,05$ по тесту Манна–Уитни; *** – $p < 0,001$ по тесту Манна–Уитни.

Figure 1. Expression profile of cytokines IL-1 β , IL-18 at the level of the oral mucosa

Note. (A) Expression of IL-1 β at the level of the oral mucosa. The abscissa shows time and groups. Y-axis relative, units of the number of copies of β -actin. $p \leq 0.05$ according to the Mann–Whitney test. (B) Expression of IL-1 β at the level of the oral mucosa. The abscissa shows time and groups. Y-axis Relative units of number of β -actin copies. *, $p \leq 0.05$ according to the Mann–Whitney test; **, $0.001 < p \leq 0.05$ according to the Mann–Whitney test; ***, $p < 0.001$ according to the Mann–Whitney test;

далее подвергались статистическому анализу. Статистическая обработка результатов проводилась с использованием программного обеспечения GraphPad ver. 8.

Результаты и обсуждение

Поскольку вирус SARS-CoV-2 инфицирует в первую очередь слизистый эпителий верхних дыхательных путей, то основная вирусная нагрузка приходится на эпителий слизистой оболочки ротоглотки.

Достоверно увеличивается в $2,7 \times 10^3$ раза экспрессия провоспалительного цитокина IL-1 β на 30-й день тяжелого течения заболевания COVID-19 относительно группы условно здоровых лиц (рис. 1). Также нами было выявлено достоверное увеличение в $6,8 \times 10^2$ раза экспрессия IL-1 β на 30-й день течения заболевания COVID-19 относительно группы лиц с тяжелым течением заболевания на 15-е сутки. Так же нами было выявлено незначительное увеличение уровня экспрессии IL-1 β как в дебюте заболевания, так и на 15-е сутки от начала заболевания, однако

достоверных отличий от группы условно здоровых лиц выявлено не было (рис. 2).

Что касается провоспалительного цитокина IL-18, то нами было выявлено достоверное снижение уровня экспрессии в $1,3 \times 10^2$ раза у лиц в дебюте заболевания COVID-19 относительно группы условно здоровых лиц (рис. 1). Также нами выявлена тенденция к увеличению уровня экспрессии в последующие дни заболевания, в частности, тенденция к увеличению уровня экспрессии на 30-е сутки относительно 15 суток от начала заболевания, однако достоверных отличий не было выявлено. Касаемо продукции нами было выявлено снижение уровня продукции IL-18 на уровне слизистой оболочки ротоглотки в дебюте заболевания относительно контрольной группы, однако достоверных отличий не было выявлено (рис. 3).

Касаемо TNF α нами было выявлено достоверное увеличение уровня экспрессии в 9,2 раза у пациентов в дебюте заболевания относительно контрольной группы (рис. 2). Относительно продукции TNF α на уровне слизистой оболочки ротоглотки было выявлено увеличение в 1,89 раза в

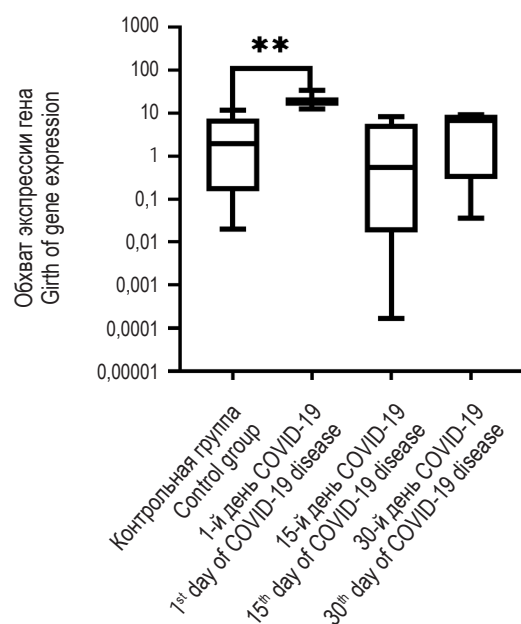


Рисунок 2. Экспрессия TNF α на уровне слизистой оболочки ротовой полости

Примечание. По оси абсцисс – время и группы. По оси ординат – относительные единицы от числа копий β -актина. ** – $0,001 < p \leq 0,05$ по тесту Манна–Уитни.

Figure 2. TNF α expression at the level of the oral mucosa.
Note. The abscissa shows time and groups. Y-axis, relative units of the number of copies of β -actin. **, $0,001 < p \leq 0,05$ according to the Mann–Whitney test.

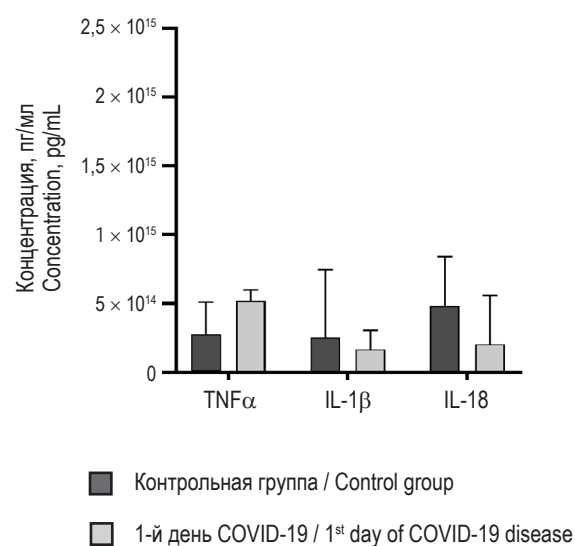


Рисунок 3. Продукция цитокинов IL-1 β , IL-18, TNF α на уровне слизистой оболочки ротовой полости

Примечание. По оси абсцисс – группы и белок. По оси ординат – концентрации (пг/мл). Серым цветом – 1-й день заболевания COVID-19. Черным цветом – контрольная группа.

Figure 3. Production of cytokines IL-1 β , IL-18, TNF α at the level of the oral mucosa
Note. The abscissa shows groups and proteins. Y-axis concentration (pg/mL). Gray color, 1 day of COVID-19 disease. Black color, control group.

начале заболевания относительно условно здоровой группы лиц (рис. 3).

Поскольку, как было сказано ранее, заболевание COVID-19 имеет двухфазное течение, основная цитокиновая нагрузка происходит в фазу, когда вирус SARS-CoV-2 почти не реплицируется, т. е. на 8-15-е сутки. Такое повышение уровня экспрессии IL-1 β на 30-е сутки с момента начала заболевания может объясняться тем, что S-белок вируса индуцирует повышенную экспрессию в моноцитах человека [5], однако уровень белка при этом остается низким в особенности на 1-е сутки от начала заболевания (рис. 2). Таким образом можно сделать вывод, что вирус запускает пироптоз, но в течение 15-30 суток от начала заболевания, когда вирусная репликация уже минимальна. Этот факт, возможно, и приводит к серьезным последствиям, таким как: полиорганная недостаточность, респираторный дистресс-синдром, а также к длительному периоду восстановления («постковидный» синдром). Сниженный уровень экспрессии и продукции провоспалительных цитокинов IL-1 β , IL-18 в дебюте заболевания с последующим увеличением уровня экспрессии на 15-30-е сутки свидетельствует о гипервоспалительной реакции врожденной иммунной системы в ответ на элиминацию вируса [8] IL-6, IL-8, IL-10 и sTNFR1 (soluble tumor necrosis

factor receptor 1. Касаемо уровня экспрессии и продукции TNF α , то наши данные в полной мере согласуются с литературными источниками. Qing Ye, Bili Wang в своем исследовании показали также повышенные уровни продукции TNF α и привели корреляцию с тем, что такие высокие уровни TNF α способствуют возникновению острого респираторного дистресс-синдрома [11].

Благодарности

Авторы выражают благодарность центру коллективного пользования НИИВС им И.И. Мечникова. Исследование выполнено с использованием научного оборудования центра коллективного пользования «НИИВС им. И.И. Мечникова» – при финансовой поддержке проекта Российской Федерацией в лице Министерства образования и науки России, Соглашение № 075-15-2021-676 от 28.07.2021.

Авторы выражают благодарность сотрудникам, старшему врачу-терапевту Осипцову В.Н., а также начальнику 2-го терапевтического отделения Татевосову В.Р. ФГКУЗ «Главный военный клинический госпиталь войск национальной гвардии Российской Федерации» за предоставление материала исследования

Список литературы / References

1. Василевский И.В. Роль цитокинов при инфекции SARS-CoV-2 и пути блокады цитокинового шторма // *Здравоохранение*, 2022. № 3. С. 31-41. [Vasilevsky I.V. The role of cytokines in SARS-CoV-2 infection and the cytokine storm blockade. *Zdravookhraneniye = Healthcare*, 2022, no. 3, pp. 31-41. (In Russ.)]
2. Carty M., Guy C., Bowie A.G. Detection of viral infections by innate immunity. *Biochem. Pharmacol.*, 2021, Vol. 183, 114316. doi: 10.1016/j.bcp.2020.114316.
3. Channappanavar R., Fehr A.R., Vijay R., Mack M., Zhao J., Meyerholz D.K., Perlman S. Dysregulated type I interferon and inflammatory monocyte-macrophage responses cause lethal pneumonia in SARS-CoV-infected mice. *Cell Host Microbe*, 2016, Vol. 19, no 2, pp. 181-193.
4. Davidson S., Maini M.K., Wack A. Disease-promoting effects of type I interferons in viral, bacterial, and coinfections. *Interferon Cytokine Res.*, 2015, Vol. 35, no. 4, pp. 252-264.
5. Hirano T., Murakami M. COVID-19: A new virus, but a familiar receptor and cytokine release syndrome. *Immunity*, 2020, Vol. 52, no 5, pp. 731-733.
6. Hu B., Guo H., Zhou P., Shi Z.-L. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2021, Vol. 19, no 3, pp. 141-154.
7. Maini R.N., Elliott M.J., Brennan F.M., Feldmann M. Beneficial effects of tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) blockade in rheumatoid arthritis (RA). *Clin. Exp. Immunol.*, 1995, Vol. 101, no. 2, pp. 207-212.
8. McElvaney O.J., McEvoy N.L., McElvaney O.F., Carroll T.P., Murphy M.P., Dunlea D.M., Ní Choileáin O., Clarke J., O'Connor E., Hogan G., Ryan D., Sulaiman I., Gunaratnam C., Branagan P., O'Brien M.E., Morgan R.K., Costello R.W., Hurley K., Walsh S., de Barra E., McNally C., McConkey S., Boland F., Galvin S., Kiernan F.,

O'Rourke J., Dwyer R., Power M., Geoghegan P., Larkin C., O'Leary R.A., Freeman J., Gaffney A., Marsh B., Curley G.F., McElvaney N.G. Characterization of the inflammatory response to severe COVID-19 illness. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2020, Vol. 202, no 6, pp. 812-821.

9. Pantazi I., Al-Qahtani A.A., Alhamlan F.S., Alotheid H., Matou-Nasri S., Sourvinos G., Vergadi E., Tsatsanis C. SARS-CoV-2/ACE2 Interaction suppresses IRAK-M expression and promotes pro-inflammatory cytokine production in macrophages. *Front. Immunol.*, 2021, Vol. 12, 683800. doi: 10.3389/fimmu.2021.683800.

10. Wiersinga W.J., Rhodes A., Cheng A.C., Peacock S.J., Prescott H.C. Pathophysiology, transmission, diagnosis, and treatment of coronavirus disease 2019 (COVID-19): A Review. *JAMA*, 2020, Vol. 324, no. 8, pp. 782-793.

11. Ye Q., Wang B., Mao J. The pathogenesis and treatment of the 'Cytokine Storm' in COVID-19. *J. Infect.*, 2020, Vol. 80, no 6, pp. 607-613.

Авторы:

Абрамова Н.Д. — младший научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

Меремьянина Е.А. — к.м.н., научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова»; старший преподаватель кафедры вирусологии ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования», Москва, Россия

Калюжная Н.О. — младший научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

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

Authors:

Abramova N.D., Junior Research Associate, Laboratory of Molecular Immunology, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

Meremyanina E.A., PhD (Medicine), Research Associate, Laboratory of Molecular Immunology, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera; Senior Lecturer, Department of Virology, Russian Medical Academy of Continuous Professional Education, Moscow, Russian Federation

Kalyuzhnaya N.O., Junior Research Associate, Laboratory of Molecular Immunology, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

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

Костинов М.П. — д.м.н., профессор, член-корр. РАН, заведующий лабораторией вакцинопрофилактики и иммунотерапии аллергических заболеваний, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова»; профессор кафедры эпидемиологии и современных технологий вакцинации ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ (Сеченовский университет), Москва, Россия

Греченко В.В. — к.м.н., доцент кафедры иммунологии МБФ ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Свитич О.А. — д.м.н., профессор, член-корр. 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 ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ (Сеченовский университет), Москва, Россия

Kostinov M.P., PhD, MD (Medicine), Professor, Corresponding Member, Russian Academy of Sciences, Head, Laboratory of Vaccination and Immunotherapy of Allergic Diseases, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera; Professor, Department of Epidemiology and Modern Technologies of Vaccination, I. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation

Grechenko V.V., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Immunology, N. Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russian Federation

Svitich O.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Corresponding Member, Russian Academy of Sciences, Director, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera; Professor, Department of Microbiology, Virology and Immunology, I. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation

Поступила 10.07.2023
Принята к печати 12.07.2023

Received 10.07.2023
Accepted 12.07.2023

ЗНАЧИМОСТЬ ОПРЕДЕЛЕНИЯ УРОВНЕЙ МОЛЕКУЛ TREC И KREC В ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ДЛЯ ПРОГНОЗА ИСХОДА ЗАБОЛЕВАНИЯ COVID-19 В ОСТРЫЙ ПЕРИОД

Сайтгалина М.А.¹, Останкова Ю.В.¹, Арсентьева Н.Е.¹,
Коробова З.Р.^{1,4}, Любимова Н.Е.¹, Кащенко В.А.^{2,3}, Куликов А.Н.⁴,
Певцов Д.Э.⁴, Станевич О.В.^{4,5}, Черных Е.И.², Тотолян Арег А.^{1,4}

¹ ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера», Санкт-Петербург, Россия

² ФГБУ «Северо-Западный окружной научно-клинический центр имени Л.Г. Соколова Федерального медико-биологического агентства», Санкт-Петербург, Россия

³ ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург, Россия

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

⁵ ФГБУ «Научно-исследовательский институт гриппа имени А.А. Смородиной» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Заболевание, вызываемое высококонтагиозным вирусом SARS-CoV-2, — «новая корона-вирусная инфекция (COVID-19)» — на конец декабря 2022 года привело к смерти более 6,5 млн человек. Тяжесть проявления инфекционного процесса варьирует от бессимптомных форм до быстрого прогрессирования в жизнеугрожающие состояния, требующие экстренных мер. Одним из факторов, выраженность которых влияет на исход заболевания, является лимфопения, причиной которой может быть нарушение лимфопоэза. Выявление лабораторных маркеров высокого риска смертности больных с COVID-19 играет важную роль для совершенствования алгоритмов оказания помощи пациентам и повышения их выживаемости. В качестве молекулярных маркеров степени выраженности T- и B-лимфопений могут служить уровни молекул TREC и KREC в периферической крови соответственно. Целью нашей работы был сравнительный анализ уровней молекул TREC и KREC в периферической крови выживших и умерших больных COVID-19. Материалом служили образцы цельной крови, полученные от 1745 человек, в том числе: 1028 больных с диагнозом «новая корона-вирусная инфекция (COVID-19)» (код по МКБ-10 — U07.1), из которых 937 пациентов выздоровели и 91 умер; 717 условно здоровых лиц (контрольная группа). Оценку уровней молекул TREC и KREC

Адрес для переписки:

Сайтгалина Мария Александровна
ФБУН «Санкт-Петербургский
научно-исследовательский институт эпидемиологии
и микробиологии имени Пастера»
197101, Россия, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14.
Тел.: 8 (981) 834-66-32.
E-mail: sajgalinam@mail.ru

Address for correspondence:

Maria A. Saitgalina
Saint Petersburg Pasteur Institute
14 Mira St
St. Petersburg
197101 Russian Federation
Phone: +7 (981) 834-66-32.
E-mail: sajgalinam@mail.ru

Образец цитирования:

М.А. Сайтгалина, Ю.В. Останкова, Н.Е. Арсентьева,
З.Р. Коробова, Н.Е. Любимова, В.А. Кащенко,
А.Н. Куликов, Д.Э. Певцов, О.В. Станевич,
Е.И. Черных, Арег А. Тотолян «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.

doi: 10.46235/1028-7221-14714-LOT

© Сайтгалина М.А. и соавт., 2023

Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

M.A. Saitgalina, Yu.V. Ostankova, N.A. Arsentieva,
Z.R. Korobova, N.E. Liubimova, V.A. Kashchenko,
A.N. Kulikov, D.E. Pevtsov, O.V. Stanevich, E.I. Chernykh,
Areg A. Totolian "Levels of TREC and KREC molecules
significance determining in peripheral blood for predicting
the outcome of COVID-19 disease in the acute period",
Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii
Zhurnal, 2023, Vol. 26, no. 4, pp. 611-618.

doi: 10.46235/1028-7221-14714-LOT

© Saitgalina M.A. et al., 2023

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

DOI: 10.46235/1028-7221-14714-LOT

проводили методом количественной мультиплексной Real-time ПЦР с использованием набора реагентов «TREC/KREC-AMP PS» (ФБУН НИИ Пастера, СПб). Установлены статистически значимые различия уровней молекул KREC и TREC между контрольной группой и пациентами, как выжившими, так и умершими. Показано достоверное снижение медианных значений концентраций молекул KREC у пациентов с летальным исходом по сравнению с выжившими ($p = 0,0019$, 95% ДИ). Среди умерших пациентов в 63,7% случаев уровни молекул TREC или KREC были снижены относительно соответствующих возрастных норм. Из них в 20,9% случаев у пациентов были снижены оба аналита. При оценке методом анализа ROC-кривых диагностической значимости уровней исследуемых аналитов для прогнозирования исхода заболевания, величина площади под кривой AUC для KREC составила $0,63 \pm 0,029$, что свидетельствует о средней силе прогностической модели наступления смерти пациента в зависимости от уровня KREC в крови. Построенная модель является статистически значимой ($p = 0,002$). Мониторинг лабораторных показателей пациентов с COVID-19, в том числе умерших, позволяет определять прогностические факторы, являющиеся наиболее существенными для оценки исхода заболевания. Построенная на базе оценки уровня KREC прогностическая модель с высокой специфичностью отражает риск наступления летального исхода у больных COVID-19. Таким образом, количественное определение уровня молекул KREC в периферической крови можно отнести к методам превентивной персонифицированной диагностики, направленной на повышение выживаемости больных.

Ключевые слова: COVID-19, SARS-CoV-2, исход заболевания, TREC, KREC, лабораторная диагностика, прогностические маркеры

LEVELS OF TREC AND KREC MOLECULES SIGNIFICANCE DETERMINING IN PERIPHERAL BLOOD FOR PREDICTING THE OUTCOME OF COVID-19 DISEASE IN THE ACUTE PERIOD

Saitgalina M.A.^a, Ostankova Yu.V.^a, Arsentieva N.A.^a, Korobova Z.R.^{a,d}, Liubimova N.E.^a, Kashchenko V.A.^{b,c}, Kulikov A.N.^d, Pevtsov D.E.^d, Stanevich O.V.^{d,e}, Chernykh E.I.^b, Totolian Areg A.^{a,d}

^a Saint Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation

^b L. Sokolov North-Western District Scientific and Clinical Center, Federal Medical and Biological Agency, St. Petersburg, Russian Federation

^c St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation

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

^e A. Smorodintsev Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. The disease caused by the highly contagious SARS-CoV-2 virus – “novel coronavirus infection (COVID-19)” – had killed more than 6.5 million people at the end of December 2022. The severity of the manifestation of the infectious process varies from asymptomatic forms to rapid progression to life-threatening conditions requiring emergency measures. One of the factors, the severity of which affects the outcome of the disease, is lymphopenia, the cause of which may be a violation of lymphopoiesis. The identification of laboratory markers of a high risk of mortality in patients with COVID-19 plays an important role in improving patient care algorithms and increasing their survival. Levels of TREC and KREC molecules in peripheral blood, respectively, can serve as molecular markers of the severity of T and B lymphopenias. The aim of our work was a comparative analysis of the levels of TREC and KREC molecules in the peripheral blood of surviving and deceased patients with COVID-19. The material was whole blood samples obtained from 1745 people, including: 1028 patients diagnosed with novel coronavirus infection (COVID-19) (ICD-10 code – U07.1), of which 937 patients recovered and 91 died; 717 apparently healthy individuals (control group). The levels of TREC and KREC molecules were assessed by quantitative multiplex Real-time PCR using the TREC/KREC-AMP PS reagent kit (Federal Scientific Research Institute Pasteur, St. Petersburg). Statistically significant differences in the levels of KREC and TREC molecules between the control group and patients, both surviving and deceased, were established. A significant decrease in median concentrations of KREC molecules was shown in patients with a lethal outcome compared with survivors ($p = 0.0019$, 95% CI). Among the deceased patients, in 63.7%

of cases, the levels of TREC or KREC molecules were reduced relative to the corresponding age norms. Of these, in 20.9% of cases, both analytes were reduced in patients. When assessing the diagnostic significance of the levels of the analytes under study for predicting the outcome of the disease, the area under the AUC curve for KREC was 0.63 ± 0.029 , which indicates the average strength of the prognostic model of the patient's death depending on the level of KREC in the blood. The constructed model is statistically significant ($p = 0.002$). Monitoring laboratory parameters of patients with COVID-19, including those who died, allows you to determine the prognostic factors that are most significant for assessing the outcome of the disease. Based on the assessment of the KREC level, a predictive model with high specificity reflects the risk of death in patients with COVID-19. Thus, the quantitative determination of the level of KREC molecules in the peripheral blood can be attributed to the methods of preventive personalized diagnostics aimed at improving the survival of patients.

Keywords: COVID-19, SARS-CoV-2, disease outcome, TREC, KREC, laboratory diagnostics, predictive markers

Введение

С момента регистрации первого случая заражения человека новым бета-коронавирусом SARS-CoV-2 (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2) в декабре 2019 года всего за один год число заразившихся превысило 93 млн человек [8]. Согласно данным Всемирной организации здравоохранения, количество связанных с инфекцией смертей на декабрь 2022 года по всему миру превысило шесть с половиной миллионов человек. В Российской Федерации это число приближается к отметке четырехста тысяч человек.

Заболевание, вызываемое вирусом SARS-CoV-2 – «новая коронавирусная инфекция (COVID-19)» (код по МКБ-10 – U07.1), – сопровождается развитием у инфицированных гриппоподобных симптомов, наиболее общими из которых являются лихорадка, кашель, одышка, боль в горле, головная боль, повышенная утомляемость, конъюнктивит и желудочно-кишечные расстройства. Инфекционный процесс может сопровождаться развитием тяжелых состояний, вызванных интерстициальными пневмониями, острым респираторным дистресс-синдромом (ОРДС), полиорганной и острой дыхательной недостаточностью, что в некоторых случаях приводит к смерти пациентов [9].

Тяжесть проявления инфекционного процесса варьирует от бессимптомных форм до быстрого прогрессирования в жизнеугрожающие состояния, требующие экстренных мер. К факторам риска развития осложнений и летальных исходов относят возраст старше 65 лет, сопутствующие хронические легочные и сердечно-сосудистые заболевания, гипертонию, сахарный диабет [13, 15].

По литературным данным уровень смертности от заражения SARS-CoV-2 составляет 2-5%. Этот показатель меньше, чем для других бета-коронавирусов (SARS-CoV – 10%, MERS-CoV – 35%). Однако высокая контагиозность SARS-CoV-2 (индекс репродукции SARS-CoV-2 составляет 2,5-2,9), наряду с системным негативным влиянием инфекции на организм, обуславливают быстрое распространение и большое количество смертей, вызванных COVID-19 [6, 12].

Выявление лабораторных маркеров высокого риска смертности больных с COVID-19 играет важную роль для совершенствования алгоритмов оказания помощи тяжелым пациентам и повышения их выживаемости. Известно, что вирус SARS-CoV-2 способен нарушать лимфопоэз, поражать лимфоциты и усиливать их апоптоз, вызывая лимфопению. Выраженность лимфопении является одним из факторов, влияющих на прогноз исхода заболевания [8].

В качестве молекулярных маркеров степени выраженности Т- и В-лимфопений могут служить уровни в периферической крови небольших молекул кольцевой ДНК Т-рецепторных эксцизионных колец (англ. T cell receptor excision circles – TREC) и каппа-делеционных рекомбинационных эксцизионных колец (англ. kappa-deleting recombination excision circles – KREC) соответственно. Формирование молекул TREC и KREC происходит на определенных стадиях дифференцировки предшественников Т-лимфоцитов в тимусе и В-лимфоцитов в костном мозге путем инициации процессов генетических перестроек и рекомбинаций нуклеотидных последовательностей, кодирующих рецепторный аппарат лимфоцитарных клеток. В ходе таких реаранжировок часть генетического материала вырезается из генома как побочный продукт, при этом вырезанная нуклеотидная последовательность замыкается в кольцо. Такие кольца называют эксцизионными кольцами: Т-клеточными – TREC и В-клеточными – KREC. Эксцизионные кольца TREC и KREC в дальнейшем существует в той лимфоцитарной клетке, в которой они были сформированы, и не реплицируются с дальнейшей пролиферацией лимфоцита при его активации антигеном [10, 11].

Исходя из вышесказанного, уровни молекул TREC и KREC можно рассматривать как количественный маркер созревающих в центральных лимфоидных органах недифференцированных Т- и В-клеток соответственно, а также наивных Т- и В-лимфоцитов, вышедших на периферию.

Цель работы – сравнительный анализ уровней молекул TREC и KREC в периферической крови выживших и умерших больных COVID-19.

Материалы и методы

Материалом служили образцы цельной крови, полученные от 1745 человек, в том числе: 1028 больных с диагнозом «новая коронавирусная инфекция (COVID-19)» (код по МКБ-10 – U07.1), из которых 937 пациентов выздоровели и 91 умер; 717 условно здоровых лиц (контрольная группа). Критерием исключения являлось наличие у обследуемых диагноза иммунодефицит любого генеза, вирус иммунодефицита человека (ВИЧ), вирусные гепатиты. Образцы крови больных были получены от пациентов с подтвержденным диагнозом «новая коронавирусная инфекция (COVID-19)», наблюдавшихся в инфекционных отделениях Клинической больницы №122 им. Л.Г. Соколова и Университетской клиники Первого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. акад. И.П. Павлова. В работу брали образцы крови, полученные от больных, инфицированных в период с мая 2021 года по март 2022 года. В качестве контрольных использовали образцы цельной крови, полученные от условно здоровых добровольцев в возрасте от 18 до 108 лет в медицинском центре ФБУН «Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера» в рамках программы оценки популяционного иммунитета жителей Санкт-Петербурга.

Все процедуры соответствовали этическим стандартам институционального и/или национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 года и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики. Дизайн исследования был одобрен локальным этическим комитетом ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера». Исследования проводили при письменном согласии пациентов.

Взятие крови осуществляли в пробирку с антикоагулянтом ЭДТА. Экстракцию тотальной ДНК из лейкоцитарной фракции венозной периферической крови проводили с использованием набора «РИБО-преп» (ЦНИИ Эпидемиологии, Москва). Для оценки уровней молекул TREC и KREC со всеми образцами тотальной ДНК проводили количественную мультиплексную Real-time ПЦР – набор реагентов «TREC/KREC-AMP PS» (ФБУН НИИ Пастера, СПб). В одной пробирке одновременно амплифицировали фрагменты последовательностей TREC, KREC, а также фрагменты генов HPRT и RPP30, которые были выбраны в качестве нормировочных генов. Для количественной оценки в каждом запуске ПЦР амплифицировали серию из пяти калибраторов с известной концентрацией перечисленных выше генетических фрагментов [2].

Статистическую обработку данных проводили с применением пакетов программного обеспечения GraphPad Prizm 5, StatTech и Microsoft

Excel 2010. Нормальность распределения полученных данных оценивали согласно критерию Колмогорова–Смирнова. Сравнительный анализ независимых выборок пациентов проводили с использованием критериев Манна–Уитни, Краскела–Уоллиса и ROC-анализа.

Результаты и обсуждение

Статистический анализ с применением критерия Манна–Уитни показал достоверное снижение медианных значений концентраций молекул KREC у пациентов с летальным исходом по сравнению с выжившими ($p = 0,0019$, 95% ДИ). Достоверные различия уровней молекул TREC между выборками умерших и выздоровевших отсутствуют ($p = 0,3289$, 95% ДИ). При этом установлены статистически значимые различия уровней как молекул KREC, так и молекул TREC между контрольной группой и пациентами, как выжившими, так и умершими ($p < 0,0001$, 95% ДИ) (рис. 1, 2).

Среди умерших пациентов в 63,7% (95% ДИ: 52,99–73,56%) случаев уровни молекул TREC/KREC были снижены относительно соответствующих возрастных норм [3]. Из них в 20,9% (95% ДИ: 13,06–30,67%) случаев у пациентов были одновременно снижены и TREC, и KREC. При этом абсолютное количество лимфоцитов пациентов со сниженными TREC/KREC также находилось ниже границы нормы.

Для оценки диагностической значимости уровня молекул KREC при прогнозировании исхода заболевания, применяли метод анализа ROC-кривых (рис. 3).

Величина параметра площадь под кривой AUC (area under the curve) составила $0,63 \pm 0,029$ с 95% ДИ: 0,541–0,656, что говорит о средней силе прогностической модели наступления смерти пациента в зависимости от уровня KREC в крови. Построенная модель является статистически значимой ($p = 0,002$).

Пороговое значение уровня KREC (точку cut-off) определяли по наивысшему значению индекса Юдена. Индекс Юдена отражает разницу между долей истинно положительных и долей ложноположительных результатов. Диагностический метод характеризуется наибольшей точностью при наибольшей разнице между этими величинами. Пороговое значение KREC, которое соответствовало наивысшему значению индекса Юдена, составило 14,55 копий/ 10^5 клеток. Построенная модель прогнозирует наступление летального исхода пациента при значении уровня KREC в крови ниже данной величины. Чувствительность и специфичность модели при этом составили 28,6% и 92,0% соответственно. Высокий показатель специфичности указывает на то, что пациенты с уровнем KREC выше значения 14,55 копий/ 10^5 клеток находятся вне зоны риска летального исхода с вероятностью 92,0%. Низкая

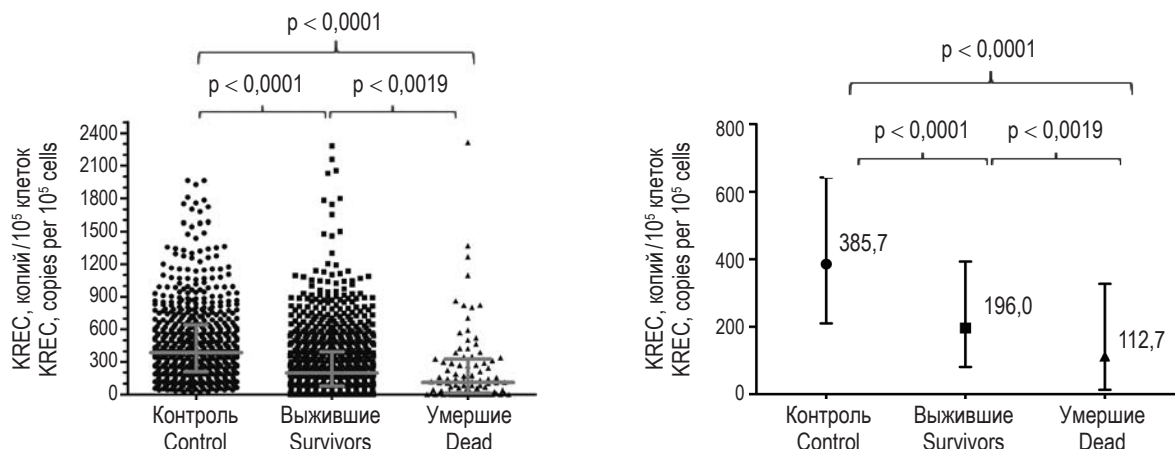


Рисунок 1. Сравнение уровней молекул KREC между группами здоровых, выжившими и умершими пациентами после перенесенной новой коронавирусной инфекции COVID-19

Примечание. Указаны медианные значения с интерквартильным размахом.

Figure 1. Comparison of KREC levels between groups of healthy, surviving and deceased patients after the novel coronavirus infection COVID-19

Note. Median values are indicated with an interquartile range.

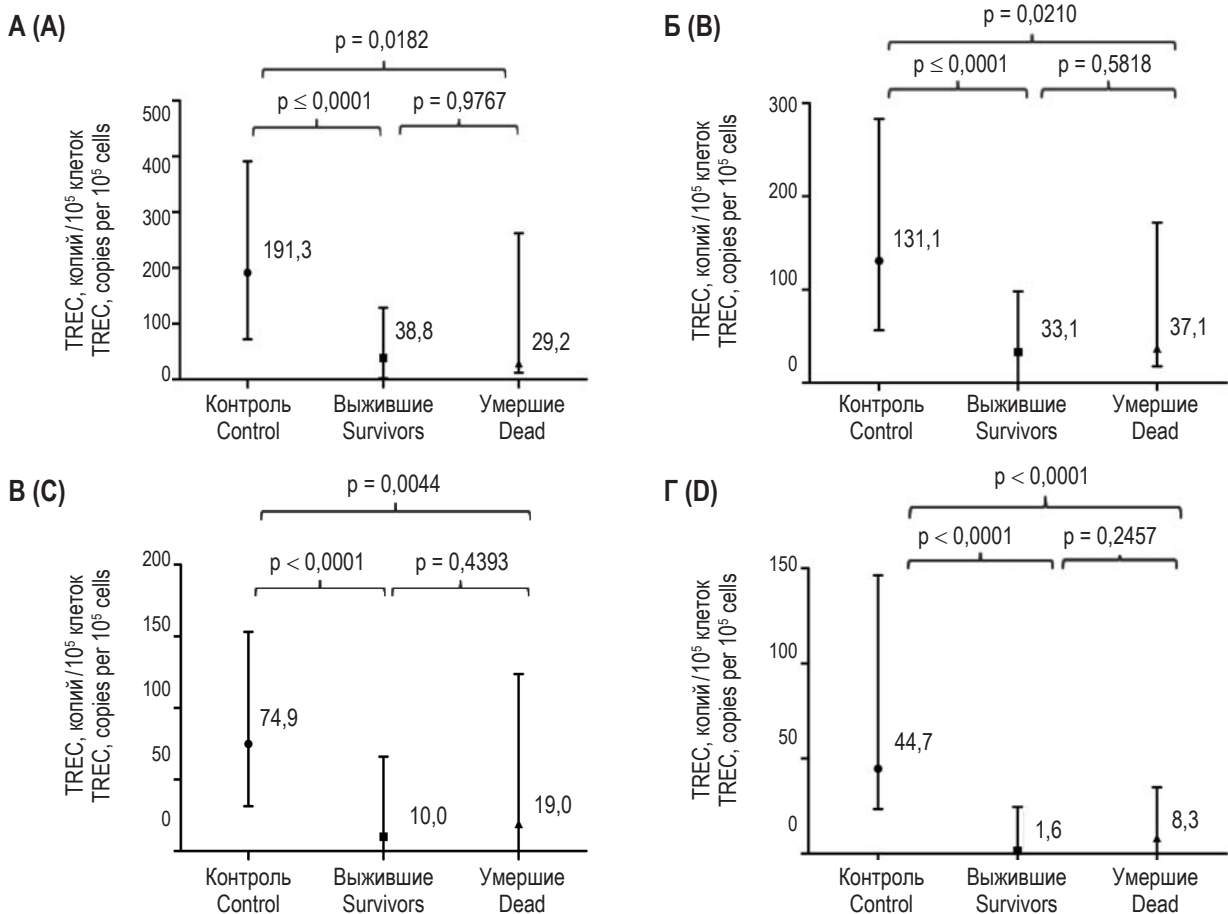


Рисунок 2. Сравнение уровней молекул TREC между группами контроля, выжившими и умершими пациентами после перенесенной новой коронавирусной инфекции COVID-19

Примечание. А – в возрасте 40-49 лет; Б – в возрасте 50-59 лет; В – в возрасте 60-69 лет; Г – старше 70 лет. Указаны медианные значения с интерквартильным размахом.

Figure 2. Comparison of TREC levels between control groups, surviving and deceased patients after the novel coronavirus infection COVID-19

Note. A, at the age of 40-49 years; B, at the age of 50-59 years; C, at the age of 60-69 years; D, over 70 years old. Median values are indicated with an interquartile range.

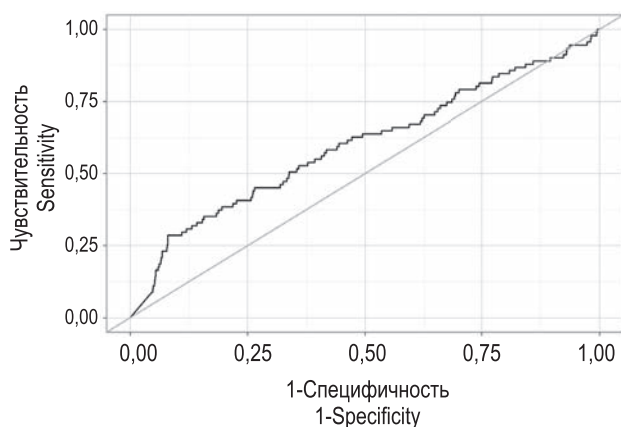


Рисунок 3. ROC-кривая, характеризующая зависимость вероятности наступления летального исхода пациента от уровня KREC

Figure 3. ROC-curve, showing the probability of death depends on the KREC levels

чувствительность диагностического метода может быть связана с тем, что наступление смерти обусловлено множеством факторов и не может быть спрогнозировано, исходя из одного параметра.

Прогностическая модель летального исхода, построенная с применением ROC-анализа по параметру TREC, не является статистически значимой. Площадь под ROC-кривой составила $0,53 \pm 0,031$ с 95% ДИ: 0,470-0,592, $p = 0,329$.

По данным литературы, в случаях со смертельным исходом больных, тяжело переносящих новую коронавирусную инфекцию COVID-19, в их крови наблюдали значительные отклонения в ряде иммунологических и биохимических параметров. У большинства таких пациентов наблюдали лимфопению, лейкопению, повышенные уровни ряда провоспалительных цитокинов, хемокинов, ростовых факторов и противовоспалительных цитокинов, С-реактивного белка, лактатдегидрогеназы, D-димера, АСТ, АЛТ, прокальцитонина и общего билирубина [1, 5, 14].

Учитывая значимые различия в содержании молекул TREC и KREC у умерших и выживших пациентов по сравнению с контролем, можно судить о нарушениях в процессах созревания как

T-, так и B-лимфоцитов при тяжелом течении инфекции COVID-19. Достоверное снижение молекул KREC в крови пациентов с летальным исходом по сравнению с выжившими говорит о более выраженных нарушениях в процессах дифференцировки B-лимфоцитов в костном мозге, что может быть одним из факторов, влияющих на исход заболевания.

Для построения релевантной прогностической модели летального исхода необходимо учитывать комплекс лабораторных показателей с применением инструментов многомерной статистики, в частности, с использованием уравнения логистической регрессии. Особое внимание при этом должно быть уделено уровням иммунологических биомаркеров, поскольку иммунопатология считается основным фактором смертности при COVID-19 [1, 4, 7].

Заключение

Мониторинг лабораторных показателей пациентов с крайне тяжелым проявлением новой коронавирусной инфекции COVID-19, в том числе умерших, позволяет определять прогностические факторы, являющиеся наиболее существенными для оценки исхода заболевания. Нарушения в дифференцировке новых клеток лимфоцитарного ряда в центральных лимфоидных органах могут влиять на развитие осложнений, вызванных COVID-19 и повышать вероятность смертельного исхода. Определение уровней молекул TREC и KREC, описанных в настоящей работе, помогает своевременно выявить и оценить такие нарушения. Согласно полученным нами результатам, построенная на базе оценки уровня молекул KREC прогностическая модель с высокой специфичностью отражает риск наступления летального исхода у больных COVID-19. Детекция ошибок в процессах лимфопоэза на фоне плохой клинической картины и искажения других предиктивных лабораторных маркеров способствует выявлению пациентов с повышенным риском летального исхода и помогает вовремя назначить таким пациентам специализированное лечение. Таким образом, количественную оценку уровня KREC можно отнести к методам превентивной персонализированной диагностики, направленной на повышение выживаемости больных.

Список литературы / References

1. Арсентьева Н.А., Любимова Н.Е., Батунов О.К., Коробова З.Р., Кузнецова Р.Н., Рубинштейн А.А., Станевич О.В., Лебедева А.А., Воробьев Е.А., Воробьева С.В., Куликов А.Н., Гаврилова Е.Г., Певцов Д.Э., Полушин Ю.С., Шлык И.В., Тотолян Арег А. Прогнозная значимость специфических цитокинов в отношении летального исхода COVID-19 // *Инфекция и иммунитет*, 2022. Т. 12, № 5. С. 859-868. [Arsentieva N.A., Liubimova N.E., Batsunov O.K., Korobova Z.R., Kuznetsova R.N., Rubinstein A.A., Stanevich O.V., Lebedeva A.A., Vorobyov E.A., Vorobyova S.V., Kulikov A.N., Gavrilova E.G., Pevtsov D.E., Polushin Yu.S., Shlyk I.V. Totolian Areg A. Predictive value of specific cytokines for lethal COVID-19 outcome. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2022, Vol. 12, no. 5, pp. 859-868. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-PVO-2043.
2. Сайтгалина М.А., Останкова Ю.В., Любимова Н.Е., Семенов А.В., Кузнецова Р.Н., Тотолян Арег 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. [Saitgalina M.A., Ostankova Y.V., Liubimova N.E., Semenov A.V., Kuznetsova R.N., Totolian Areg A. Modified quantitative approach for assessing peripheral blood TREC and KREC levels in immunodeficient patients. *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.

3. Сайтгалина М.А., Любимова Н.Е., Останкова Ю.В., Кузнецова Р.Н., Тотолян Арег 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 [Saitgalina M.A., Liubimova N.E., Ostankova Yu.V., Kuznetsova R.N., Totolian Areg A. Determination of reference values for TREC and KREC in circulating blood of the persons over 18 years. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2022, Vol. 24, no. 6, pp. 1227-1236. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-DOR-2587.

4. Щербак С.Г., Камилова Т.А., Голота А.С., Вологжанин Д.А. Факторы риска тяжелого течения и летального исхода COVID-19 // Физическая и реабилитационная медицина, медицинская реабилитация. 2022. Т. 4, №1. С. 14-36. [Scherbak S.G., Kamilova T.A., Golota A.S., Vologzhanin D.A. Risk factors of the severe course and fatal outcome in COVID-19. *Phizicheskaya i reabilitatsionnaya meditsina, meditsinskaya reabilitatsiya = Physical and Rehabilitation Medicine, Medical Rehabilitation*. 2022, Vol. 4, no. 1, pp. 14-36. (In Russ.)]

5. Fu L., Wang Bi., Yuan T., Chen X., Ao Y., Fitzpatrick T., Li P., Zhou Y., Lin Y.F., Duan Q., Luo G., Fan S., Lu Y., Feng A., Zhan Y., Liang B., Cai W., Zhang L., Du X., Li L., Shu Y., Zou H.. Clinical characteristics of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) in China: a systematic review and meta-analysis. *J. Infect.*, 2020, Vol. 80, no. 6, pp. 656-665.

6. Habas K., Nganwuchu C., Shahzad F., Gopalan R., Haque M., Rahman S., Majumder A.A., Nasim T. Resolution of coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Expert. Rev. Anti Infect. Ther.*, 2020, Vol. 18, no. 12, pp. 1201-1211.

7. Kudryavtsev I.V., Arsentieva N.A., Batsunov O.K., Korobova Z.R., Khamitova I.V., Isakov D.V., Kuznetsova R.N., Rubinstein A.A., Stanevich O.V., Lebedeva A.A., Vorobyov E.A., Vorobyova S.V., Kulikov A.N., Sharapova M.A., Pevtcov D.E., Totolian Areg A. Alterations in B cell and follicular T-helper cell subsets in patients with acute COVID-19 and COVID-19 Convalescents. *Curr. Issues Mol. Biol.*, 2021, Vol. 44, no. 1, pp. 194-205.

8. Ochani R., Asad A., Yasmin F., Shaikh S., Khalid H., Batra S., Sohail M.R., Mahmood S.F., Ochani R., Hussham Arshad M., Kumar A., Surani S. COVID-19 pandemic: from origins to outcomes. A comprehensive review of viral pathogenesis, clinical manifestations, diagnostic evaluation, and management. *Infez. Med.*, 2021, Vol. 29, no. 1, pp. 20-36.

9. Pascarella G., Strumia A., Piliago C., Bruno F., del Buono R., Costa F., Scarlata S., Agrò F.E. COVID-19 diagnosis and management: a comprehensive review. *J. Intern. Med.*, 2020, Vol. 288, no. 2, pp. 192-206.

10. Serana F., Chiarini M., Zanotti C., Sottini A., Bertoli D., Bosio A., Caimi L., Imberti L. Use of V(D)J recombination excision circles to identify T- and B-cell defects and to monitor the treatment in primary and acquired immunodeficiencies. *J. Transl. Med.*, 2013, Vol. 11, 119. doi: 10.1186/1479-5876-11-119.

11. van Zelm M.C., van der Burg M., Langerak A.W., van Dongen J.J. PID comes full circle: applications of V(D) J recombination excision circles in research, diagnostics and newborn screening of primary immunodeficiency disorders. *Front. Immunol.*, 2011, Vol. 2, 12. doi: 10.3389/fimmu.2011.00012.

12. Wu Z., McGoogan J.M. Characteristics of and important lessons from the coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak in China: Summary of a report of 72 314 cases from the chinese center for disease control and prevention. *JAMA*, 2020, Vol. 323, no. 13, pp. 1239-1242.

13. Yang J., Zheng Y., Gou X., Pu K., Chen Z., Guo Q., Ji R., Wang H., Wang Y., Zhou Y. Prevalence of comorbidities in the novel Wuhan coronavirus (COVID-19) infection: a systematic review and meta-analysis. *Int. J. Infect. Dis.*, 2020, Vol. 94, pp. 91-95.

14. Zhao X., Zhang B., Li P., Ma Ch. Incidence, clinical characteristic and prognostic factor of patients with COVID-19: a systematic review and meta-analysis. *medRxiv*, 2020, Vol. 12, no. 19, pp. 18853-18865.

15. Zhou F., Yu T., Du R., Fan G., Liu Y., Liu Z., Xiang J., Wang Y., Song B., Gu X., Guan L., Wei Y., Li H., Wu X., Xu J., Tu S., Zhang Y., Chen H., Cao B. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. *Lancet*, 2020, Vol. 395, pp. 1054-1062.

Авторы:

Сайтгалина М.А. – младший научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера», Санкт-Петербург, Россия

Останкова Ю.В. – к.б.н., заведующая лабораторией иммунологии и вирусологии ВИЧ-инфекции, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера», Санкт-Петербург, Россия

Authors:

Saitgalina M.A., Junior Research Associate, Laboratory of Molecular Immunology, Saint Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation

Ostankova Yu.V., PhD (Biology), Head, Laboratory of Immunology and Virology HIV, Senior Research Associate, Laboratory of Molecular Immunology Saint Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation

Арсентьева Н.А. — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера», Санкт-Петербург, Россия

Arsentieva N.A., PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Molecular Immunology, Saint Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation

Коробова З.Р. — младший научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера»; старший лаборант кафедры иммунологии ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова», Санкт-Петербург, Россия

Korobova Z.R., Junior Research Associate, Laboratory of Molecular Immunology, Saint Petersburg Pasteur Institute; Senior Laboratory Assistant, Department of Immunology, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Любимова Н.Е. — к.б.н., научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера», Санкт-Петербург, Россия

Liubimova N.E., PhD (Biology), Research Associate, Laboratory of Molecular Immunology, Saint Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation

Каценко В.А. — д.м.н., профессор, заместитель генерального директора по научно-образовательной работе ФГБУ «Северо-Западный окружной научно-клинический центр имени Л.Г. Соколова Федерального медико-биологического агентства»; заведующий кафедрой факультетской хирургии ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург, Россия

Kashchenko V.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Deputy Head, Scientific Department, L. Sokolov North-Western District Scientific and Clinical Center, Federal Medical and Biological Agency; Head, Faculty Surgery Department, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation

Куликов А.Н. — д.м.н., профессор, ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Kulikov A.N., PhD, MD (Medicine), Professor, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Певцов Д.Э. — к.м.н., врач-трансфузиолог ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Pevtsov D.E., PhD (Medicine), Transfusiologist, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Станевич О.В. — врач-инфекционист отдела эпидемиологии ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ; аспирант ФГБУ «Научно-исследовательский институт гриппа имени А.А. Смородинцева» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Stanevich O.V., Infectionist, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University; Postgraduate Student, A. Smorodintsev Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russian Federation

Черных Е.И. — к.м.н., врач-терапевт приемного отделения ФГБУ «Северо-Западный окружной научно-клинический центр имени Л.Г. Соколова Федерального медико-биологического агентства», Санкт-Петербург, Россия

Chernykh E.I., PhD (Medicine), Therapist, L. Sokolov North-Western District Scientific and Clinical Center, Federal Medical and Biological Agency, St. Petersburg, Russian Federation

Тотolian Арег А. — д.м.н., профессор, академик РАН, заведующий лабораторией молекулярной иммунологии, директор ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера»; заведующий кафедрой иммунологии ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Totolian Areg A., PhD, MD (Medicine), Professor, Full Member, Russian Academy of Sciences, Head, Laboratory of Molecular Immunology, Director, Saint Petersburg Pasteur Institute; Head, Department of Immunology, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

ОСОБЕННОСТИ ИММУННОГО СТАТУСА ПАЦИЕНТОВ С ОСТРЫМ КОРОНАРНЫМ СИНДРОМОМ, БОЛЕВШИХ И НЕ БОЛЕВШИХ COVID-19, В ЗАВИСИМОСТИ ОТ УРОВНЯ V1-ЛИМФОЦИТОВ

Сафронова Э.А.¹, Рябова Л.В.¹, Зурочка А.В.^{2,3}

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

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

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

Резюме. Целью исследования явилось изучение показателей корпускулярных элементов крови и фагоцитарной активности нейтрофилов у лиц с острым коронарным синдромом в зависимости от того, перенесли они или нет COVID-19.

Обследовано 65 мужчин от 35 до 65 лет с острым коронарным синдромом (острый инфаркт миокарда и нестабильная стенокардия). Всем больным в течение 3 суток с момента поступления в стационар выполнена коронарография и стентирование коронарных артерий. Проведено обследование: общий анализ крови стандартизованным методом на гематологическом анализаторе Medonic M20 (Швеция). Из иммунологических показателей проводилась оценка фагоцитарной активности нейтрофилов. Спонтанная и индуцированная НСТ-активность нейтрофилов определялись методом световой микроскопии с использованием микроскопов Olimpus (Япония). Фагоцитарную активность нейтрофилов регистрировали по их способности поглощать частицы латекса. С помощью проточной цитометрии проводилось определение V1-лимфоцитов.

Все больные в зависимости от содержания V1-лимфоцитов и наличия или отсутствия COVID-19 были разделены на 6 групп: болевшие COVID-19 и имеющие пониженные V1-лимфоциты (1-я группа), нормальные (2-я группа), повышенные (3-я группа); не болевшие COVID-19 и имеющие пониженные V1-лимфоциты (4-я группа), нормальные (5-я группа), повышенные (6-я группа). Количество лейкоцитов в общем анализе крови достоверно выше, средний корпускулярный объем гемоглобина ниже у пациентов, перенесших COVID-19. Уровень тромбоцитов был выше у пациентов, перенесших COVID-19, максимально с нормальными V1-лимфоцитами. Наибольшее число моноцитов регистрировалось у лиц с COVID-19 и нормальными V1-лимфоцитами, а минимальное – у боль-

Адрес для переписки:

Сафронова Элеонора Аркадьевна
ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный
медицинский университет» Министерства
здравоохранения РФ
454076, 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
454076 Russian Federation
Phone: +7 (982) 316-34-71.
E-mail: safronovaeleonora68@gmail.com

Образец цитирования:

Э.А. Сафронова, Л.В. Рябова, А.В. Зурочка
«Особенности иммунного статуса пациентов с острым
коронарным синдромом, болевших и не болевших
COVID-19, в зависимости от уровня V1-лимфоцитов»
// Российский иммунологический журнал, 2023. Т. 26,
№ 4. С. 619-626.
doi: 10.46235/1028-7221-13989-FOI
© Сафронова Э.А. и соавт., 2023
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

E.A. Safronova, L.V. Ryabova, A.V. Zurochka "Features
of immune status in patients with acute coronary syndrome
with and without COVID-19, depending on the level of
V1 lymphocytes", Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy
Immunologicheskii Zhurnal, 2023, Vol. 26, no. 4, pp. 619-626.
doi: 10.46235/1028-7221-13989-FOI
© Safronova E.A. et al., 2023
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.46235/1028-7221-13989-FOI

ных 4-й группы. Наибольшее количество гранулоцитов отмечалось у лиц, не болевших COVID-19, со сниженными В1-лимфоцитами. Тромбоцитокрит был максимальным у пациентов 2-й группы. Активность и интенсивность фагоцитоза нейтрофилов была ниже у лиц, имевших COVID-19 в анамнезе и повышенные В1-лимфоциты. Фагоцитарное число нейтрофилов было минимальным у больных без COVID-19 и имевших низкие В1-лимфоциты. Максимальная спонтанная НСТ-активность регистрировалась у лиц с высокими В1-лимфоцитами и COVID-19 в анамнезе, а минимальная – с низкими В1-лимфоцитами и перенесенным COVID-19. НСТ спонтанный индекс также был наиболее высоким у больных 3-й группы. Минимальные НСТ-индуцированная активность и индекс были в 1-й группе. Наиболее тяжелые больные были в 1-й и 2-й группах. В 1-й группе: у 50% выставлен диагноз «острый инфаркт миокарда», у 2 пациентов случился тромбоз стентов, 4 погибли. У больных с нормальными В1 клетками и COVID-19 в анамнезе: 2 пациента скончались, у 2 – тромбоз стентов, у 65% регистрировался острый инфаркт миокарда. В этих группах были выше уровни тромбоцитов и ниже НСТ-активность, как спонтанная, так и индуцированная.

У пациентов с острым коронарным синдромом и перенесенным COVID-19, в сопоставлении с лицами без COVID-19 в анамнезе, отмечается увеличение числа лейкоцитов, тромбоцитов, снижение активности и интенсивности фагоцитоза нейтрофилов, спонтанной и стимулированной НСТ-активности, максимально выраженное у больных с низкими В1-лимфоцитами. Наиболее тяжелые в клиническом плане пациенты были в группе лиц, перенесших COVID-19 и имеющих низкие В1-лимфоциты.

Ключевые слова: В1-лимфоциты, COVID-19, острый коронарный синдром, лимфоциты, иммунная система, стентирование коронарных артерий

FEATURES OF IMMUNE STATUS IN PATIENTS WITH ACUTE CORONARY SYNDROME WITH AND WITHOUT COVID-19, DEPENDING ON THE LEVEL OF B1 LYMPHOCYTES

Safronova E.A.^a, Ryabova L.V.^a, Zurochka A.V.^{b, c}

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

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

^c South Ural State University (National Research University), Chelyabinsk, Russian Federation

Abstract. The aim of our study was to evaluate the blood cell indices and phagocytic activity of neutrophils in persons with acute coronary syndrome, depending on their history of COVID-19 infection.

The study involved 65 males aged 35 to 65 years with acute coronary syndrome (acute myocardial infarction and unstable angina pectoris). All patients underwent coronary angiography and stenting of the coronary arteries within 3 days from the terms of admission to the hospital. The following clinical examination were carried out: a general blood test by a standardized method on a hematological analyzer Medonic M20 (Sweden). Of immunological indices, the phagocytic activity of neutrophils was assessed. Spontaneous and induced NBT test of neutrophils was determined by light microscopy using light microscopy (Olimpus, Japan). The phagocytic activity of neutrophils was recorded by their ability to absorb latex particles. B1 lymphocytes were determined using flow cytometry.

All patients, depending on the content of B1 lymphocytes and the presence or absence of COVID-19 in previous history, were divided into 6 groups: patients with COVID-19 and those with reduced (group 1), normal (group 2), or elevated number of B1 lymphocytes (group 3). The patients who did not have COVID-19 were also classified into those with low (group 4), normal (group 5), or elevated B1 lymphocytes (group 6). The numbers of leukocytes in routine blood test were significantly higher, and the average corpuscular volume of hemoglobin was lower in the patients who have undergone COVID-19. Platelet counts were higher in post-COVID-19 patients, being maximal at normal B1 lymphocytes. The largest number of monocytes was recorded in patients with COVID-19 and normal B1 lymphocytes, and the minimal content of monocytes was registered in patients of group 4. The highest number of granulocytes was observed in individuals who did not have COVID-19, with reduced B1 lymphocytes. Thrombocytocrit was the highest in group 2 patients. The activity and intensity of neutrophil phagocytosis was lower in individuals with a history of COVID-19 and elevated B1 lymphocytes. The phagocytic number of neutrophils was minimal in those patients without COVID-19 who had low B1 lymphocytes. The maximal spontaneous HBT activity was recorded in individuals with high B1 lymphocytes and a history of COVID-19, and the minimal values have been recorded in those with low B1 lymphocytes and

previous COVID-19. NBT spontaneous index was also the highest in patients of the 3rd group. The minimal NBT-induced activity and index were noted in group 1. The most severe patients were in groups 1 and 2. In group 1, 50% were diagnosed with acute myocardial infarction, stent thrombosis was diagnosed in 2 patients, four patients deceased. Among patients with normal B1 cell contents and a history of COVID-19, 2 patients died, 2 patients had stent thrombosis, 65% had acute myocardial infarction. These groups had higher platelet levels and lower HBT activity, both spontaneous and induced.

In patients with acute coronary syndrome and prior COVID-19, in comparison with persons without a history of COVID-19, there is an increased number of leukocytes, platelets, a decrease in the activity and intensity of neutrophil phagocytosis, spontaneous and stimulated NBT activity, which was most pronounced in patients with low B1 lymphocytes. The most clinically severe patients were found in the group of people who had undergone COVID-19 and had low B1 lymphocytes.

Keywords: B1 lymphocytes, cytotoxic T cells, COVID-19, acute coronary syndrome, lymphocytes, immune system, coronary artery stenting

Введение

Широко признано, что как врожденный, так и адаптивный иммунный ответ важны для инициации и прогрессирования атеросклероза, который в основном состоит из моноцитов, макрофагов, нейтрофилов, Т-лимфоцитов и В-лимфоцитов [7]. В работе Volodarsky I. и соавт. [10] было показано, что воспаление играет важную роль в нестабильности бляшек и острых коронарных синдромах. Циркулирующие регуляторные В-клетки снижены у пациентов с острым инфарктом миокарда (ОИМ) по сравнению с пациентами со стабильной стенокардией напряжения. Исследование Casarotti A.C.A. и соавт. [2] было направлено на оценку роли подтипов В-лимфоцитов и родственных цитокинов в массе инфаркта и фракции выброса левого желудочка, полученных с помощью магнитно-резонансной томографии сердца, выполненной через 30 дней после ОИМ с подъемом сегмента ST (ОИМпST). У пациентов с ОИМпST, несмотря на раннюю реперфузию, объем поражения и фракция выброса левого желудочка были связаны с воспалительными реакциями, запускаемыми циркулирующими В-лимфоцитами. Уровень В2-лимфоцитов явился предиктором изменения фракции выброса левого желудочка на 30-й день.

Целью исследования явилось изучение показателей корпускулярных элементов крови и фагоцитарной активности нейтрофилов у лиц с острым коронарным синдромом в зависимости от того, перенесли они или нет COVID-19.

Материалы и методы

Обследовано 65 пациентов с острым коронарным синдромом (острый инфаркт миокарда и нестабильная стенокардия). Всем больным в течение 3 суток с момента поступления в стационар выполнена коронарография (КАГ) и стентирование коронарных артерий. Возраст пациентов от 35 до 65 лет. Все мужчины. Кроме общеклинических

исследований, выполнены КАГ, а также иммунологические обследования. Перед обследованием все пациенты подписывали информированное согласие (протокол Этического комитета ЮУГМУ Минздрава России № 9 от 11.09.2006 и протокол этического комитета ГАУЗ ОТКЗ ГКБ № 1 г. Челябинска № 12 от 10.10.2022).

Проведено обследование: общий анализ крови – лейкоцитарный, эритроцитарный и тромбоцитарный ростки кроветворения, количественный и качественный состав ростков кроветворения проведен стандартизованным методом на гематологическом анализаторе Medonic M20 (Швеция). 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.

С помощью проточной цитометрии проводилось определение В1-лимфоцитов [1]. Все больные в зависимости от содержания В1-лимфоцитов и наличия или отсутствия COVID-19 были разделены на 6 групп: болевшие COVID-19 и имеющие пониженные В1-лимфоциты (1-я группа), нормальные (2-я группа), повышенные (3-я группа); не болевшие COVID-19 и имеющие пониженные В1-лимфоциты (4-я группа), нормальные (5-я группа), повышенные (6-я группа).

Результаты и обсуждение

В таблице 1 представлены данные корпускулярных элементов крови и фагоцитарной активности нейтрофилов у пациентов с острым коронарным синдромом, болевших и не болевших COVID-19.

ТАБЛИЦА 1. ПОКАЗАТЕЛИ КОРПУСКУЛЯРНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ КРОВИ И ФАГОЦИТАРНОЙ АКТИВНОСТИ НЕЙТРОФИЛОВ У ПАЦИЕНТОВ С ОСТРЫМ КОРОНАРНЫМ СИНДРОМОМ, ПЕРЕНЕСШИХ ИЛИ НЕТ COVID-19

TABLE 1. INDICATORS OF BLOOD CORPUSCULAR ELEMENTS AND PHAGOCYTIC ACTIVITY OF NEUTROPHILS IN PATIENTS WITH ACUTE CORONARY SYNDROME WITH OR WITHOUT COVID-19

Показатель / Index	Болевшие COVID-19 / Sick with COVID-19			Не болевшие COVID-19 / Not sick with COVID-19		
	понижены downgraded (n = 19)	нормальные normal (n = 19)	повышены raised (n = 7)	понижены downgraded (n = 5)	нормальные normal (n = 11)	повышены raised (n = 4)
Лейкоциты крови, 10⁹ кл/л Blood leukocytes, 10 ⁹ cells/L	8,500±0,960 P _{1,2} = 0,049	10,863±1,090 P _{2,5} = 0,049	9,685±0,821	10,740±2,743	8,254±0,767	10,025±1,423
Эритроциты крови, 10¹²/л Blood erythrocytes, 10 ⁹ cells/L	4,730±0,135 P _{1,3} = 0,016	4,945±0,092 P _{2,3} = 0,015 P _{2,4} = 0,041	5,378±0,189 P _{3,4} = 0,037	4,362±0,551	4,938±0,187	5,130±0,329
Средний корпускулярный объем гемоглобина, пг Mean corpuscular volume of hemoglobin, pg	29,000±0,791	29,531±0,605 P _{2,3} = 0,037	27,400±0,542 P _{3,4} = 0,001 P _{3,5} = 0,018	30,640±0,331	29,982±0,701	28,700±2,311
Средняя концентрация корпускулярного гемоглобина Medium concentration corpuscular hemoglobin, g/L	334,684±2,648 P _{1,5} = 0,017	337,263±2,871	332,571±3,046 P _{3,5} = 0,013	333,600±7,724	343,545±2,495	338,250±6,860
Тромбоциты крови, 10⁹ кл/л Blood platelets, 10 ⁹ cells/L	263,947±21,547 P _{1,2} = 0,044	321,211±24,683 P _{2,3} = 0,036 P _{2,4} = 0,041	242,285±15,182	230,200±21,631	260,909±29,751	248,250±23,531
Лимфоциты, % Lymphocytes, %	24,526±2,218 P _{1,3} = 0,038	25,263±2,424	32,714±4,127 P _{3,4} = 0,031	18,200±5,911 P _{4,5} = 0,041	28,000±2,381	33,500±7,029
Моноциты, % Monocytes, %	10,578±0,702 P _{1,4} = 0,015	9,947±0,504 P _{2,4} = 0,012	9,285±0,521 P _{3,4} = 0,049	7,000±1,414	9,181±0,658	9,250±2,015
Сегментоядерные нейтрофилы, % Segmented neutrophils, %	58,684±2,188 P _{1,3} = 0,049	58,526±1,951 P _{2,3} = 0,041	51,142±4,142 P _{3,4} = 0,031	65,000±5,282	58,000±2,763	52,500±7,263
Палочкоядерные нейтрофилы, % Stab neutrophils, %	3,647±0,921	3,326±0,579	4,157±1,327	8,000±3,361 P _{4,5} = 0,013	2,281±0,502	2,025±1,064
Лимфоциты, 10⁹ кл/л Lymphocytes, 10 ⁹ cells/L	1,897±0,179 P _{1,2} = 0,026 P _{1,3} = 0,003 P _{1,6} = 0,004	2,586±0,293 P _{2,4} = 0,040	3,005±0,265 P _{3,4} = 0,003 P _{3,5} = 0,020	1,480±0,360 P _{4,5} = 0,039 P _{4,6} = 0,003	2,239±0,214 P _{5,6} = 0,021	3,067±0,111
Моноциты, 10⁹ кл/л Monocytes, 10 ⁹ cells/L	0,867±0,091	1,113±0,159 P _{2,4} = 0,049 P _{2,5} = 0,049	0,894±0,084 P _{3,4} = 0,049	0,636±0,142	0,743±0,073	0,980±0,291
Гранулоциты, 10⁹ кл/л Granulocytes, 10 ⁹ cells/L	5,735±0,838	7,163±0,936	5,785±0,858	8,624±2,818 P _{4,5} = 0,049	5,271±0,587	5,977±1,301

Таблица 1 (окончание)
Table 1 (continued)

Показатель / Index	Болезни COVID-19 / Sick with COVID-19			Не болевшие COVID-19 / Not sick with COVID-19		
	понижены downgraded (n = 19)	нормальные normal (n = 19)	повышены raised (n = 7)	понижены downgraded (n = 5)	нормальные normal (n = 11)	повышены raised (n = 4)
В1-клетки B1 cells						
Ширина распределения клеток красной крови Distribution width of red blood cells, %	15,263±0,412 P _{1,2} = 0,044 P _{1,3} = 0,003	14,463±0,308 P _{2,3} = 0,011 P _{2,4} = 0,046	13,114±0,311 P _{3,4} = 0,005 P _{3,5} = 0,008 P _{3,6} = 0,007	15,800±0,944	14,763±0,449	15,275±0,796
Тромбоцитокрит, % Thrombocytocrit, %	0,201±0,018 P _{1,2} = 0,049	0,246±0,021 P _{2,3} = 0,012	0,161±0,010 P _{3,4} = 0,49	0,192±0,014	0,198±0,021	0,180±0,021
Средний объем тромбоцита, fL Mean platelet volume, fL	7,757±0,243 P _{1,3} = 0,014 P _{1,4} = 0,043	7,763±0,212 P _{2,3} = 0,007 P _{2,4} = 0,026	6,800±0,129 P _{3,4} = 0,001 P _{3,5} = 0,004	8,640±0,181 P _{4,5} = 0,036 P _{4,6} = 0,009	7,845±0,259	7,275±0,449
Ширина распределения тромбоцита, % Platelet distribution width, %	12,257±0,222	12,057±0,143 P _{2,3} = 0,008	12,828±0,313 P _{3,6} = 0,044	12,560±0,299	12,427±0,309	11,900±0,324
Активность фагоцитоза нейтрофилов, % Neutrophil phagocytosis activity, %	40,631±4,614 P _{1,5} = 0,027	48,944±4,402 P _{2,3} = 0,021	32,857±3,931 P _{3,4} = 0,006 P _{3,5} = 0,002	54,400±6,353	54,727±4,653	41,000±14,335
Интенсивность фагоцитоза нейтрофилов, усл. ед. Intensity of phagocytosis of neutrophils, conv. units	1,662±0,281 P _{1,5} = 0,017	1,604±0,211 P _{2,5} = 0,003	1,315±0,273 P _{3,5} = 0,001	1,502±0,254 P _{4,5} = 0,007	2,570±0,226	2,082±1,007
Фагоцитарное число нейтрофилов Phagocytic number of neutrophils	3,665±0,364 P _{1,4} = 0,049 P _{1,5} = 0,024	3,150±0,201 P _{2,3} = 0,049 P _{2,4} = 0,049 P _{2,5} = 0,001 P _{2,6} = 0,011	3,914±0,508 P _{3,4} = 0,029	2,360±0,487 P _{4,5} = 0,007 P _{4,6} = 0,022	5,027±0,595	4,500±0,777
Нитросиний тетразолий (НСТ) спонтанная активность, % Nitroblue tetrazolium (NBT) spontaneous activity, %	25,947±3,442 P _{1,3} = 0,005 P _{1,5} = 0,049	35,000±3,110 P _{2,3} = 0,047	49,428±10,947	28,000±5,186	35,727±5,454	26,250±6,156
НСТ спонтанный индекс, усл. ед. NBT spontaneous index, conv. units	0,414±0,065 P _{1,3} = 0,009 P _{1,5} = 0,039	0,499±0,045 P _{2,3} = 0,017	0,807±0,191 P _{3,4} = 0,049	0,392±0,088	0,626±0,104	0,460±0,136
НСТ индуцированная активность, % NBT induced activity, %	53,578±15,945 P _{1,2} = 0,002 P _{1,5} = 0,005	69,111±3,305	63,428±8,780	59,600±9,211	71,181±5,736	61,000±9,495
НСТ индуцированный индекс, усл. ед. NBT induced index, conv. units	0,708±0,066 P _{1,2} = 0,002 P _{1,3} = 0,045 P _{1,5} = 0,004	1,008±0,069	1,040±0,261	0,908±0,199	1,063±0,119	0,795±0,138

Согласно представленным данным, количество лейкоцитов в общем анализе крови достоверно ($p < 0,05$) выше, средний корпускулярный объем гемоглобина ниже ($p < 0,05$) у пациентов, перенесших COVID-19. Уровень тромбоцитов был выше у пациентов, перенесших COVID-19, максимально с нормальными В1-лимфоцитами. Максимальное число моноцитов регистрировалось у лиц с COVID-19 и нормальными В1-лимфоцитами, а минимальное – у больных 4-й группы. Наибольшее количество гранулоцитов отмечалось у лиц, не болевших новой коронавирусной инфекцией (НКВИ) со сниженными В1-лимфоцитами. Тромбоцитокрит был максимальным у пациентов 2-й группы. Активность и интенсивность фагоцитоза нейтрофилов была ниже у лиц, имевших НКВИ в анамнезе и повышенные В1-лимфоциты. Фагоцитарное число нейтрофилов было минимальным у больных без НКВИ в анамнезе и имевших низкие В1-лимфоциты. Максимальная спонтанная НСТ-активность регистрировалась у лиц с высокими В1-лимфоцитами и НКВИ в анамнезе, а минимальная – с низкими В1-лимфоцитами и перенесенным COVID-19. НСТ спонтанный индекс также был наиболее высоким у больных 3-й группы. Минимальные НСТ-индуцированная активность и индекс были в 1-й группе. Что касается клинической характеристики, то в 4-й группе 20% имели инфаркт миокарда, не было тромбозов стентов и летальных исходов. В 5-й группе 5 из 11 больных имели ОИМ, не было умерших и тромбозов стентов. 6-я группа: нет летальных исходов, все пациенты только с нестабильной стенокардией. То, что касается лиц, перенесших COVID-19 в клиническом плане. 1-я группа – у 50% выставлен диагноз «ОИМ», у 2 пациентов случился тромбоз стентов, 4 погибли. У больных с нормальными В1-клетками и НКВИ в анамнезе: 2 пациента скончались, у 2 – тромбоз стентов, у 65% регистрировался ОИМ. В 3-й группе не было умерших, не было тромбозов стентов, ОИМ был у 5 из 7 больных. Поэтому в клиническом плане более тяжелые пациенты с перенесенной НКВИ и нормальными или пониженными В1-лимфоцитами. В этих группах были выше уровни тромбоцитов и ниже НСТ-активность, как спонтанная, так и индуцированная.

Мопасо С. и соавт. [6] было показано, что существует аутореактивная В-клеточная память после ОИМ. Гибель сердечных клеток приводит к высвобождению антигенов, которые индуцируют гуморальный иммунный ответ, что приводит к накоплению иммуноглобулинов в бляшках и, в конечном итоге, к усилению атерогенеза в отдаленных участках.

Zouggari Y. и соавт. [11] проиллюстрировали в своем исследовании, что после ОИМ у мышей зрелые В-лимфоциты индуцируют мобилизацию и использование моноцитов в миокарде, что приводит к усилению повреждения тканей и ухудшению функции миокарда. Kim N.D. и соавт. [4] показали, что после ОИМ циркулирующие В-клетки продуцируют хемокин Ccl7, который мобилизует воспалительные моноциты из костного мозга в кровь, после чего они затем возвращаются в поврежденное сердце. Истощение В-клеток после ОИМ ограничивает повреждение миокарда и улучшает функцию миокарда.

В работе Мо F. и соавт. [5] было продемонстрировано, что активированные В-клетки участвуют в устойчивом состоянии воспаления миокарда и активации иммунной системы после ОИМ и могут влиять на метаболизм миокардиального коллагена после ОИМ путем секреции цитокинов. Кроме того, В-клетки способствуют экспрессии миокардиального коллагена типа I и типа III и повреждают функцию выброса левого желудочка. Cohen K.W. и соавт. [3] в своем исследовании проиллюстрировали, что связывающие и нейтрализующие антитела против SARS-CoV-2 демонстрируют двухфазный распад с увеличенным периодом полураспада более 200 дней, что предполагает образование долгоживущих плазматических клеток.

В своей работе Sosa-Hernández V.A. и соавт. [9] показали, что тяжесть течения COVID-19 сопровождается изменениями в субпопуляциях В-клеток, либо незрелых, либо терминально дифференцированных. Кроме того, существующая взаимосвязь частот подмножества В-клеток с клиническими и лабораторными параметрами предполагает, что эти лимфоциты могут служить потенциальными биомаркерами и даже активными участниками адаптивного противовирусного ответа, направленного против SARS-CoV-2.

Выводы

1. У пациентов с острым коронарным синдромом и перенесенным COVID-19, в сопоставлении с лицами без НКВИ в анамнезе, отмечается увеличение числа лейкоцитов, тромбоцитов, снижение активности и интенсивности фагоцитоза нейтрофилов, спонтанной и стимулированной НСТ-активности, максимально выраженное у больных с низкими В1-лимфоцитами.

2. Наиболее тяжелые в клиническом плане пациенты были в группе лиц, перенесших COVID-19 и имеющих низкие В1-лимфоциты.

Список литературы / References

1. Зурочка А.В., Хайдуков С.В., Кудрявцев И.В., Черешнев В.А. Проточная цитометрия в медицине и биологии. 2 изд., доп. и расш. Екатеринбург:РИО УрО РАН, 2014. 576 с. [Zurochka A.V., Khaidukov S.V., Kudryavtsev I.V., Chereshev V.A. Flow cytometry in medicine and biology. 2nd edition supplemented and expanded]. Yekaterinburg: RIO Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, 2014. 576 p.
2. Casarotti A.C.A., Teixeira D., Longo-Maugeri I.M., Ishimura M.E., Coste M.E.R., Bianco H.T., Moreira F.T., Bacchin A.F., Izar M.C., Gonçalves I., Caixeta A., Szarf G., Pinto I.M., Fonseca F.A. Role of B lymphocytes in the infarcted mass in patients with acute myocardial infarction. *Biosci. Rep.*, 2021, Feb 26, Vol. 41, no 2, BSR20203413. doi: 10.1042/BSR20203413.
3. Cohen K.W., Linderman S.L., Moodie Z., Czartoski J., Lai L., Mantus G., Norwood C., Nyhoff L.E., Edara V.V., Floyd K., De Rosa S.C., Ahmed H., Whaley R., Patel S.N., Prigmore B., Lemos M.P., Davis C.W., Furth S., O'Keefe J.B., Gharpure M.P., Gunisetty S., Stephens K., Antia R., Zarnitsyna V.I., Stephens D.S., Edupuganti S., Roupheal N., Anderson E.J., Mehta A.K., Wrammert J., Suthar M.S., Ahmed R., McElrath M.J.. Longitudinal analysis shows durable and broad immune memory after SARS-CoV-2 infection with persisting antibody responses and memory B and T cells. *Cell Rep. Med.*, 2021, Vol. 2, no. 7, 100354. doi: 10.1016/j.xcrm.2021.100354.
4. Kim N.D., Luster A.D. To B or not to B-that is the question for myocardial infarction. *Nat. Med.*, 2013 Vol. 19, no. 10, pp. 1208-1210.
5. Mo F., Luo Y., Yan Y., Li J., Lai S., Wu W. Are activated B cells involved in the process of myocardial fibrosis after acute myocardial infarction? An in vivo experiment. *BMC Cardiovasc. Disord.*, 2021, Vol. 21, 5. doi: 10.1186/s12872-020-01775-9.
6. Monaco C., Cole J. Does a myocardial infarction boost your (B cell) memory? *Eur. Heart J.*, 2021, Vol. 42, no. 9, pp. 948-950.
7. Moriya J. Critical roles of inflammation in atherosclerosis. *J. Cardiol.*, 2019, Vol. 73, no. 1, pp. 22-27.
8. Savchenko A.A., Tikhonova E., Kudryavtsev I., Kudlay D., Korsunsky I., Beleniuk V., Borisov A. TREC/ KREC levels and T and B lymphocyte subpopulations in COVID-19 patients at different stages of the disease. *Viruses*, 2022, Vol. 14, no. 3, 646. doi: 10.3390/v14030646.
9. Sosa-Hernández V.A., Torres-Ruiz J., Cervantes-Díaz R., Romero-Ramírez S., Páez-Franco J.C., Meza-Sánchez D.E., Juárez-Vega G., Pérez-Fragoso A., Ortiz-Navarrete V., Ponce-de-León A., Llorente L., Berrón-Ruiz L., Mejía-Domínguez N.R., Gómez-Martín D., Maravillas-Montero J.L. B cell subsets as severity-associated signatures in COVID-19 Patients. *Front. Immunol.*, 2020, Vol. 11, 611004. doi: 10.3389/fimmu.2020.611004.
10. Volodarsky I., Shimoni S., Haberman D., Mirkin V., Fabrikant Y., Yoskovich Mashriki T., Zalik A., George J. Circulating regulatory B-lymphocytes in patients with acute myocardial infarction: A pilot study. *J. Cardiovasc. Dev. Dis.*, 2022, Vol. 10, no. 1, 2. doi: 10.3390/jcdd10010002.
11. Zougari Y., Ait-Oufella H., Bonnin P., Simon T., Sage A.P., Guérin C., Vilar J., Caligiuri G., Tsiantoulas D., Laurans L., Dumeau E., Kotti S., Bruneval P., Charo I.F., Binder C.J., Danchin N., Tedgui A., Tedder T.F., Silvestre J.S., Mallat Z. B lymphocytes trigger monocyte mobilization and impair heart function after acute myocardial infarction. *Nat. Med.*, 2013, Vol. 19, no. 10, pp. 1273-1280.

Авторы:

Сафронова Э.А. — к.м.н., доцент кафедры поликлинической терапии и клинической фармакологии ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Челябинск, Россия

Рябова Л.В. — д.м.н., 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

Authors:

Safronova E.A., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Polyclinic Therapy and Clinical Pharmacology, South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

Ryabova L.V., PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Professor, Department of Life Safety, Disaster Medicine, Emergency Medicine, South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

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

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

Поступила 14.07.2023
Принята к печати 16.07.2023

Received 14.07.2023
Accepted 16.07.2023

ДИНАМИКА ПОКАЗАТЕЛЕЙ ТРОМБОЦИТОВ И D-ДИМЕРА ВАКЦИНИРОВАННЫХ ЛИЦ, ЗАБОЛЕВШИХ COVID-19, ПО СРАВНЕНИЮ С НЕ ИММУНИЗИРОВАННЫМИ ПРОТИВ ЭТОЙ ИНФЕКЦИИ

**Костинов М.П.^{1,2}, Чжан Чэнь¹, Храпунова И.А.^{1,4}, Печеник А.С.³,
Уткин В.А.⁵, Лактионова М.Н.¹, Машилов К.В.², Соловьева И.Л.⁶**

¹ ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова»
Министерства здравоохранения РФ (Сеченовский университет), Москва, Россия

² ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва,
Россия

³ Научно-исследовательский институт организации здравоохранения и медицинского управления
Департамента здравоохранения города Москвы, Москва, Россия

⁴ ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Роспотребнадзора, Москва,
Россия

⁵ ФГБУ «Северо-Кавказский федеральный научно-клинический центр» Федерального медико-биологического
агентства России, г. Ессентуки, Ставропольский край, Россия

⁶ ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный университет». г. Ульяновск, Россия

Резюме. В литературе появляется все больше данных об особенностях изменений показателей гематологического (клинического) и биохимического анализов крови у больных коронавирусной инфекцией COVID-19, которые свидетельствуют о степени тяжести проявлений инфекционного процесса коагулопатия часто коррелирует с тяжестью заболевания COVID-19 и риском летального исхода. В связи с этим на сегодняшний день вопрос прогнозирования развития коагулопатий и их профилактики остается весьма актуальным. Цель настоящего исследования – выявление различий в содержании тромбоцитов и D-димера у заболевших COVID-19, в когортах лиц вакцинированных против SARS-CoV-2 и не иммунизированных против этой инфекции.

Проведено проспективное рандомизированное обсервационное исследование реакции организма в когортах 588/52,2% вакцинированных (привитых) и 588/52,2%, не иммунизированных (не привитых) пациентов, заболевших COVID-19 в период с 23.06.2021 по 01.05.2022 г. Уровень тромбоцитов и D-димера, а также исходы заболевания у заболевших COVID-19 исследовали в динамике на 1-2-й, 5-6-й и 10-12-й день госпитализации.

Адрес для переписки:

Соловьева Ирина Леонидовна
ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный
университет»
432002, Россия, г. Ульяновск, ул. Радищева, 42.
Тел.: 8 (951) 096-73-23.
E-mail: irsol126@mail.ru

Address for correspondence:

Irina L. Solovyeva
Ulyanovsk State University
42 Radishchev St
Ulyanovsk
432002 Russian Federation
Phone: +7 (951) 096-73-23.
E-mail: irsol126@mail.ru

Образец цитирования:

М.П. Костинов, Чжан Чэнь, И.А. Храпунова,
А.С. Печеник, В.А. Уткин, М.Н. Лактионова,
К.В. Машилов, И.Л. Соловьева «Динамика показателей
тромбоцитов и D-димера вакцинированных
лиц, заболевших COVID-19, по сравнению с не
иммунизированными против этой инфекции»
// Российский иммунологический журнал, 2023. Т. 26,
№ 4. С. 627-632. doi: 10.46235/1028-7221-13983-TDC

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

For citation:

M.P. Kostinov, Zhang Chen, I.A. Khrapunova, A.S. Pechenik,
V.A. Utkin, M.N. Laktionova, K.V. Mashilov, I.L. Solovyeva
“Time-dependent changes of platelet and D-dimer parameters
in vaccinated versus non-immunized COVID-19 patients”,
Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii
Zhurnal, 2023, Vol. 26, no. 4, pp. 627-632.
doi: 10.46235/1028-7221-13983-TDC

© Kostinov M.P. et al., 2023
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.46235/1028-7221-13983-TDC

При поступлении зарегистрировано нормальное значение содержания тромбоцитов в крови в сравнительных группах, которые практически не отличались друг от друга и составили $206,58 \times 10^9$ в группе привитых и $204,85 \times 10^9$ в группе непривитых соответственно. Также при поступлении отмечено умеренное повышение концентрации D-димера в обеих группах: 2838,60 нг/мл в группе вакцинированных пациентов и 3242,08 нг/мл в группе не привитых больных. В ходе проведенного исследования показано, что динамика показателя D-димера у вакцинированных и неиммунизированных схожа по дням болезни и заключается в повышенном его содержании с первого дня заболевания и скачка в сторону еще большего увеличения, начиная с 5-6-го дня. Вместе с тем, у вакцинированных динамика несколько менее благоприятна, чем у не иммунизированных. У неиммунизированных на протяжении всего периода наблюдений показатель тромбоцитов превышает аналогичный показатель вакцинированных, что свидетельствует о большем риске у них тромбозов и «цитокиновых штормов».

Приведенные данные показывают, что динамика показателя D-димера и тромбоцитов у вакцинированных и неиммунизированных схожа по дням болезни. Однако у вакцинированных изменения более выраженные, но это не свидетельствует о большем риске неблагоприятных исходов.

Ключевые слова: новая коронавирусная инфекция, COVID-19, вакцинированные, неиммунизированные, тромбоциты, D-димер

TIME-DEPENDENT CHANGES OF PLATELET AND D-DIMER PARAMETERS IN VACCINATED VERSUS NON-IMMUNIZED COVID-19 PATIENTS

Kostinov M.P.^{a, b}, Zhang Chen^a, Khrapunova I.A.^{a, d}, Pechenik A.S.^c,
Utkin V.A.^c, Laktionova M.N.^a, Mashilov K.V.^b, Solovyeva I.L.^f

^a I. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation

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

^c Research Institute of Health Organization and Medical Management, Department of Healthcare, Moscow, Russian Federation

^d Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russian Federation

^e North Caucasus Federal Research and Clinical Center, Essentuki, Russian Federation

^f Ulyanovsk State University, Ulyanovsk, Russian Federation

Abstract. There are increasing data concerning changes in hematological (clinical) and biochemical blood tests in patients with COVID-19 infection, which indicate the severity of the manifestations of the infectious process. Coagulopathy often correlates with the severity of COVID-19 disease and the risk of death. In this regard, prediction of developing coagulopathy and its prevention remain quite relevant. The aim of our study was to identify differences in the content of platelets and D-dimer in patients with COVID-19. The study included cohorts of patients vaccinated against SARS-CoV-2, and those not immunized against this infection.

A prospective, randomized, observational study of the patients' response was performed in cohorts of 588/52.2% vaccinated (vaccinated) and 588/52.2% non-immunized (non-vaccinated) patients with diagnosed COVID-19 over the period from 23.06.2021 to 01.05.2022. The levels of blood platelets and D-dimer, as well as clinical outcomes of the disease in patients with COVID-19, were studied in dynamics on days 1-2, 5-6 and 10-12 of hospitalization.

Upon admission, the normal value of the blood platelet counts did not differ between the compared groups, being 206.58×10^9 in vaccinated group and 204.85×10^9 in the unvaccinated group, respectively. a moderate increase in the concentration of D-dimer was noted in both groups upon admission, i.e., 2838.60 ng/mL in the group of vaccinated patients and 3242.08 ng/mL among the unvaccinated patients. In the course of the study, we have shown that the dynamics of D-dimer index in vaccinated *versus* non-immunized persons was similar according to the days of disease, showing an increase from the first day and a trend towards an higher values, starting from 5-6 days. At the same time, the dynamics in the vaccinated patients was somewhat less

favorable than that of the non-immunized subjects. In the patients who were not immunized throughout the entire observation period, the platelet count exceeds the levels found in vaccinated subjects, thus suggesting higher risk of thrombosis and cytokine storm.

The data obtained show that the dynamics of D-dimer and platelet counts in vaccinated and non-immunized people is similar on appropriate terms of the illness. However, the changes are more pronounced in vaccinated cohort, but it does not indicate a greater risk of adverse outcomes.

Keywords: novel coronavirus infection, COVID-19, vaccinated, non-immunized, platelets, D-dimer

Введение

Пандемия COVID-19 поставила целый ряд новых задач и вопросов перед медициной и здравоохранением. Одной из них является частое развитие коагулопатий, которая отчетливо коррелирует с тяжестью заболевания и риском летального исхода. В связи с этим вопрос прогнозирования развития коагулопатий и их профилактики остается весьма актуальным и сегодня.

В литературе появляется все больше данных об особенностях изменений показателей гематологического (клинического) и биохимического анализов крови, у больных с коронавирусной инфекцией COVID-19, которые свидетельствуют о степени тяжести проявлений инфекционного процесса [1]. Так, было установлено, что при низком количестве тромбоцитов риск развития тяжелого течения процесса повышался более чем в 5 раз [11]. Тромбоцитопения при легком течении процесса выявлялась у 31,6% больных, а при тяжелом – у 57,7% [8]. Имеется обширная информация о показателях систем гемостаза и фибринолиза, и, в частности, об изменении уровня D-димера, содержание которого повышается у большинства тяжелых больных. Повышенный уровень D-димера у пациентов с COVID-19 является маркером наличия диссеминированной внутрисосудистой коагулопатии и тяжелого течения заболевания [10]. Учитывая, что у всех больных COVID-19 имеют место нарушения в системе гемостаза и фибринолиза, группа ученых из Швеции выдвинула гипотезу о том, что причиной этого является повреждение эндотелия сосудов [9]. Кубанов А.А. и соавт. (2020) высказали мнение о том, что COVID-19 является генерализованным вирусным васкулитом [4]. Несмотря на наличие различных подходов к пониманию патогенеза коагулопатий при COVID-19 связано с недостаточной исследованностью этого вопроса, большинство авторов сходятся на том что, основными звеньями патогенеза коагулопатий при COVID-19 являются цитокиновый шторм, цитопатическое повреждающее действие вируса на эндотелий сосудов и развитие системного васкулита [3, 7].

Влияние такого важного фактора, как предварительная иммунизация на развитие коагулопатий у лиц, которые все же заболели COVID-19, остается практически не изученным. В силу того, что показатели количества тромбоцитов и уровня содержания D-димера в плазме крови признаны самыми распространенными, дешевыми и доступными методами оценки вероятности развития коагулопатий у больных COVID-19, именно эти параметры мы исследовали у госпитализированных пациентов.

Таким образом, **целью исследования** стало выявление различий в содержании тромбоцитов и D-димера у заболевших COVID-19, в когортах лиц вакцинированных против SARS-CoV-2 и не иммунизированных против этой инфекции.

Материалы и методы

Проведено проспективное рандомизированное обсервационное исследование реакции организма в когортах 588/52,2% вакцинированных (привитых) и 588/52,2% неиммунизированных (непривитых) пациентов, госпитализированных в один из стационаров города Москвы, заболевших COVID-19 в период с 23.06.2021 по 01.05.2022 г. Содержание тромбоцитов и D-димера исследовали в динамике на 1-2-й, 5-6-й и 10-12-й день госпитализации, а также – исходы заболевания.

Исследование проводилось при добровольном информированном согласии пациентов. Протокол исследования одобрен Локальным этическим комитетом ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет) – выписка из протокола № 03-22 от 03.02.2022.

Исследования крови проводились на гематологическом анализаторе Sysmex XN-9000. Для определения концентрации D-димера использовался иммунохемилюминесцентный экспресс-анализатор PATHFAST. Тесты проводились в соответствии с инструкцией к тест-системе PATHFAST D-Dimer («Диакон», Россия).

Статистический анализ данных выполнялся большей частью в среде Excel лицензионного пакета Office 2013; отдельные непараметрические сопоставления наблюдений реализованы с ис-

пользованием встроенных модулей комплекса AtteStat v. 8.0. Нормальность распределения проверялась по Гири [5]. В сравнении рядов наблюдений, представленных неравновеликими выборками действительных переменных, использовали критерий Стьюдента, медианный критерий и ранговый критерий Вилкоксона.

Результаты и обсуждение

При поступлении мы зарегистрировали нормальное значение содержания тромбоцитов в крови в сравнительных группах, которые практически не отличались друг от друга и составили $206,58 \times 10^9$ в группе привитых и $204,85 \times 10^9$ в группе непривитых соответственно. В обеих группах отмечался достоверный ($p < 0,05$) рост числа тромбоцитов на 5-6-й день госпитализации и также на 10-12-й день наблюдения. В группе непривитых против SARS-Cov-2 больных рост этого показателя был более интенсивным. Так, на 5-6-й день госпитализации в группе не вакцинированных он составил $265,80 \times 10^9$, в то время как в группе привитых пациентов он был достоверно ниже – $231,67 \times 10^9$ ($p < 0,001$). На 10-12-й день – это различие продолжало сохраняться, и показатели составили $248,13 \times 10^9$ в группе иммунизированных больных и $275,16 \times 10^9$ ($p < 0,05$) в группе непривитых пациентов соответственно.

При поступлении мы отмечаем в обеих группах умеренное повышение концентрации D-димера: 2838,60 нг/мл в группе вакцинированных пациентов и 3242,08 нг/мл в группе непривитых больных. На 5-6-й день наблюдения этот показатель продолжает плавно нарастать в обеих группах: в группе иммунизированных пациентов

он составил 3301,00 нг/мл и в группе непривитых пациентов 2723,75 нг/мл. На 10-12-й день наблюдения показатели в обеих группах превысили нормальные значения, при этом в группе непривитых пациентов он составил 5191,62 нг/мл, а в группе вакцинированных стал достоверно выше ($p < 0,05$) и составил 9924,20 нг/мл.

В ходе исследования нам не удалось выявить драматических различий в показателях гомеостаза, связанных с возможностью развития коагулопатии у наблюдаемых больных. Более того, значительный рост уровня D-димера в группе предварительно иммунизированных больных предполагает более высокую возможность развития у этих больных коагулопатии. Однако такой прогноз вступает в явное противоречие с клиническими наблюдениями, поскольку по имеющимся данным у вакцинированных больных коагулопатии вообще не развиваются [2, 6]. Представляется возможным, что такая картина складывается в силу того, что защитные действия вакцины обусловлены в первую очередь защитой от поражения вирусами эндотелия сосудов. При этом наблюдаемое повышение содержания D-димера отражает активацию фибринолиза в рамках компенсаторной реакции.

Заключение

Приведенные данные показывают, что динамика показателя D-димера и тромбоцитов у вакцинированных и неиммунизированных схожа по дням болезни. Вместе с тем, у вакцинированных она несколько менее благоприятна, но не свидетельствует о большем риске неблагоприятных исходов.

Список литературы / References

1. Абдуллаев Р.Ю., Комиссарова О.Г. Изменения маркеров гематологического, биохимического и коагулологического анализов крови при новой коронавирусной инфекции COVID-19. *Consilium Medicum*, 2020. Т. 22, № 11. С. 51-55. [Abdullaev R.Yu., Komissarova O.G. Changes in markers of hematological, biochemical and coagulological blood tests in the new coronavirus infection COVID-19. *Consilium Medicum = Consilium Medicum*, 2020, Vol. 22, no. 11, pp. 51-55. (In Russ.)]
2. Вакцинопрофилактика COVID-19 у пациентов с коморбидными заболеваниями: Руководство для врачей / Под ред. М.П. Костинова. М.: Группа МДВ, 2022. 176 с. [Vaccination of COVID-19 in patients with comorbid diseases: A guide for doctors / Eds. M.P. Kostinov]. Moscow: Group MDV, 2022. 176 p.
3. Костинов М.П. Иммунопатогенные свойства SARS-CoV-2 как основа для выбора патогенетической терапии // *Иммунология*, 2020. Т. 41, № 1. С. 83-91. [Kostinov M.P. Immunopathogenic properties of SARS-CoV-2 as a basis for the choice of pathogenetic therapy. *Immunologiya = Immunologiya*, 2020, Vol. 41, no. 1, pp. 83-91. (In Russ.)]
4. Кубанов А.А., Дерябин Д.Г. Новый взгляд на патогенез COVID-19: заболевание является генерализованным вирусным васкулитом, а возникающее при этом поражение легочной ткани – вариантом ангиогенного отека легкого // *Вестник РАМН*, 2020. Т. 75, № 2. С. 115-117. [Kubanov A.A., Deryabin D. A new look at the COVID-19 pathogenesis: the disease is a generalized viral vasculitis, and the lung tissue damage is a variant of angiogenic pulmonary edema. *Vestnik RAMN = Annals of the Russian Academy of Medical Sciences*, 2020, Vol. 75, no. 2, pp. 115-117. (In Russ.)]

5. Лемешко Б.Ю. Критерии проверки отклонения распределения от нормального закона. Новосибирск: НГТУ, 2014. 192 с [Lemeshko B.Yu. Criteria for checking the deviation of the distribution from the normal law]. Novosibirsk: Novosibirsk State Technical University, 2014. 192 p.
6. Линец Ю.П., Артюхов С.В., Казанцев А.Н., Зайцева Т.Е., Рошковская Л.В., Соколова С.В., Чикин А.Е., Енова Г.К., Кондаков С.Б. Течение COVID-19 у вакцинированных пациентов // Журнал им. Н.В. Склифосовского «Неотложная медицинская помощь», 2021. Т. 10, № 4. С. 636-641. [Linets Yu.P., Artyukhov S.V., Kazantsev A.N., Zaitseva T.Y., Roshkovskaya L.V., Sokolova S.V., Chikin A.Y., Yenova G.K., Kondakov S.B. COVID-19 course in vaccinated patients. *Zhurnal im. N.V. Sklifosovskogo "Neotlozhnaya meditsinskaya pomoshch"* = *Russian Sklifosovsky Journal "Emergency Medical Care"*, 2021, Vol. 10, no. 4, pp. 636-641. (In Russ.)]
7. Шатохин Ю.В., Снежко И.В., Рябикина Е.В. Нарушение гемостаза при коронавирусной инфекции // Южно-Российский журнал терапевтической практики, 2021. Т. 2, № 2. С. 6-15. [Shatohin Yu.V., Snezhko I.V., Ryabikina E.V. Violation of hemostasis in coronavirus infection. *Yuzhno-Rossiyskiy zhurnal terapevticheskoy praktiki* = *South Russian Journal of Therapeutic Practice*, 2021, Vol. 2, no. 2, pp. 6-15. (In Russ.)]
8. Guan W.J., Ni Z.Y., Hu Y., Liang W.-H., Ou C.-Q., He J.-X., Liu L., Shan H., Lei C.-L., Hui D.S.C., Du B., Li L.-J., Zeng G., Yuen K.-Y., Chen R.-C., Tang C.-L., Wang T., Chen P.-Y., Xiang J., Li S.-Y., Wang J.-L., Liang Z.-J., Peng Y.-X., Wei L., Liu Y., Hu Y.-H., Peng P., Wang J.-M., Liu J.-Y., Chen Z., Li G., Zheng Z.-J., Qiu S.-Q., Luo J., Ye C.-J., Zhu S.-Y., Zhong N.-S.; China Medical Treatment Expert Group for COVID-19. Clinical characteristics of coronavirus disease 2019 in China. *N. Engl. J. Med.*, 2020, Vol. 382, pp. 1708-1720.
9. He L., Mae M.A., Muhl L., Sun Y., Pietilä R., Nahar K., Liébanas E.V., Fagerlund M.J., Oldner A., Liu J., Genové G., Zhang L., Xie Y., Leptidis S., Mocci G., Stritt S., Osman A., Anisimov A., Hemanthakumar K.A., Räsänen M., Mirabeau O., Hansson E., Björkegren J., Vanlandewijck M., Blomgren K., Mäkinen T., Peng X.-R., Arnold T.D., Alitalo K., Eriksson L.I., Lendahl U., Betsholtz C. Pericyte-specific vascular expression of SARS-CoV-2 receptor ACE2 – implications for microvascular inflammation and hypercoagulopathy in COVID-19 patients. *bioRxiv*, 2020. doi: 10.1101/2020.05.11.088500.
10. Lippi G., Favaloro E.J. D-dimer is associated with severity of coronavirus disease 2019: a pooled analysis. *Thromb. Haemost.*, 2020; Vol. 120, no. 5, pp. 876-878.
11. Lippi G., Plebani M., Henry B.M. Thrombocytopenia is associated with severe coronavirus disease 2019 (COVID-19) infections: A meta-analysis. *Clin. Chim. Acta*, 2020, Vol. 506, pp. 145-148.

Авторы:

Костинов М.П. – д.м.н., профессор, член-корр. РАН, заведующий кафедрой эпидемиологии и современных технологий вакцинации ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» (Сеченовский университет); заведующий лабораторией вакцинопрофилактики и иммунотерапии аллергических заболеваний ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

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

Храпунова И.А. – д.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории профилактики инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии Роспотребнадзора»; профессор кафедры эпидемиологии и современных технологий вакцинации Института профессионального образования ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ (Сеченовский университет), Москва, Россия

Authors:

Kostinov M.P., PhD, MD (Medicine), Professor, Corresponding Member, Russian Academy of Sciences, Head, Department of Epidemiology and Modern Technologies of Vaccination, First I. Sechenov Moscow State Medical University (Sechenov University); Head, Laboratory of Vaccination and Immunotherapy of Allergic Diseases, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

Zhang Chen, Postgraduate Student, I. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation

Khrapunova I.A., PhD, MD (Medicine), Leading Research Associate, Laboratory for Prevention of Infections Associated with the Provision of Medical Care, Central Research Institute of Epidemiology; Professor, Department of Epidemiology and Modern Vaccination Technologies, Institute of Professional Education, I. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation

Печеник А.С. — к.т.н., Научно-исследовательский институт организации здравоохранения и медицинского управления Департамента здравоохранения города Москвы, Москва, Россия

Уткин В.А. — д.м.н., ведущий научный сотрудник Центра биомедицинских технологий ФГБУ «Северо-Кавказский федеральный научно-клинический центр» Федерального медико-биологического агентства России, г. Ессентуки, Ставропольский край, Россия

Локтионова М.Н. — к.м.н., доцент кафедры эпидемиологии и современных технологий вакцинации Института профессионального образования ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ (Сеченовский университет), Москва, Россия

Машиллов К.В. — к.м.н., доцент, старший научный сотрудник лаборатории профилактической вакцинации и иммунотерапии аллергических заболеваний ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

Соловьева И.Л. — д.м.н., профессор кафедры педиатрии ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный университет». г. Ульяновск, Россия

Pechenik A.S., PhD (Technical Sciences), Research Institute of Health Organization and Medical Management, Department of Healthcare, Moscow, Russian Federation

Utkin V.A., PhD, MD (Medicine), Leading Research Associate, Center for Biomedical Technologies, North Caucasus Federal Research and Clinical Center, Essentuki, Russian Federation

Loktionova M.N., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Epidemiology and Modern Vaccination Technologies, Institute of Professional Education, I. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation

Mashilov K.V., PhD (Medicine), Associate Professor, Senior Research Associate, Laboratory of Preventive Vaccination and Immunotherapy of Allergic Diseases, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

Solovyeva I.L., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Pediatrics, Ulyanovsk State University, Ulyanovsk, Russian Federation

Поступила 10.07.2023
Принята к печати 12.07.2023

Received 10.07.2023
Accepted 12.07.2023

ГУМОРАЛЬНЫЙ ИММУННЫЙ ОТВЕТ СЛИЗИСТЫХ ДЫХАТЕЛЬНЫХ ПУТЕЙ У МЕДИЦИНСКИХ РАБОТНИКОВ В ПОСТКОВИДНОМ ПЕРИОДЕ

Крюкова Н.О.¹, Хасанова А.А.², Баранова И.А.¹, Костинов М.П.^{3,4},
Свитич О.А.^{1,3}, Чучалин А.Г.¹

¹ ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова»
Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

² ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный университет», г. Ульяновск, Россия

³ ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва,
Россия

⁴ ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова»
Министерства здравоохранения РФ (Сеченовский университет), Москва, Россия

Резюме. В настоящее время роль локальных иммуноглобулинов респираторного тракта в условиях COVID-19 и реорганизация мукозального иммунного ответа в постковидном периоде недостаточно изучены. Цель исследования – изучить влияние перенесенной новой коронавирусной инфекции на гуморальные факторы мукозального иммунитета у медицинских работников в отдаленном периоде после заболевания.

В одномоментное поперечное исследование были включены 180 медицинских работников в возрасте от 18 до 65 лет. Добровольцы с COVID-19 в анамнезе были разделены на три группы в зависимости от степени тяжести перенесенного заболевания. Контрольную группу составили 44 медицинских работников, не болевших новой коронавирусной инфекцией. Были исследованы образцы слюны, индуцированной мокроты, соскобы со слизистых носо- и ротоглотки на наличие секреторного иммуноглобулина класса А (sIgA) и общего иммуноглобулина G (IgG) с помощью иммуноферментного анализа, а также сыворотки крови, где определялись специфичные IgG против вируса SARS-CoV-2 методом ИФА.

Выявлены изменения адаптивного звена иммунного ответа на различных участках слизистых оболочек: у лиц, перенесших тяжелую и среднетяжелую формы COVID-19, концентрация sIgA в образцах секрета слюнных желез была значимо выше по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05$ и $p < 0,005$ соответственно). Уровень общего sIgA на всех участках слизистых оболочек обратно коррелировал

Адрес для переписки:

Хасанова Альбина Альбертовна
ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный
университет»
432049, Россия, г. Ульяновск, ул. Аблукова, 89.
Тел.: 8 (983) 169-18-54.
E-mail: albinafeizer@yandex.ru

Address for correspondence:

Albina A. Khasanova
Ulyanovsk State University
89 Ablukov St
Ulyanovsk
432049 Russian Federation
Phone: +7 (983) 169-18-54.
E-mail: albinafeizer@yandex.ru

Образец цитирования:

Н.О. Крюкова, А.А. Хасанова, И.А. Баранова,
М.П. Костинов, О.А. Свитич, А.Г. Чучалин «Гуморальный
иммунный ответ слизистых дыхательных путей у
медицинских работников в постковидном периоде»
// Российский иммунологический журнал, 2023. Т. 26,
№ 4. С. 633-640. doi: 10.46235/1028-7221-13921-МНИ

© Крюкова Н.О. и соавт., 2023

Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

N.O. Kryukova, A.A. Khasanova, I.A. Baranova,
M.P. Kostinov, O.A. Svitich, A.G. Chuchalin “Mucosal
humoral immune response of respiratory tract in medical
workers during the post-COVID-19 period”, Russian Journal
of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskiy Zhurnal, 2023,
Vol. 26, no. 4, pp. 633-640.
doi: 10.46235/1028-7221-13921-МНИ

© Kryukova N.O. et al., 2023

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

DOI: 10.46235/1028-7221-13921-МНИ

с числом дней от начала заболевания до проведения исследования ($r = 0,278$, $p < 0,05$). У всех переболевших определено достоверно значимое повышение концентрации общего IgG в образцах индуцированной мокроты по сравнению с контрольной группой. В группе тяжелого течения заболевания отмечалось увеличение концентрации общего IgG в образцах секрета слюнных желез ($p < 0,05$), а также тенденция к статистически значимому повышению на других участках слизистых оболочек за исключением носовой полости. Выявлено, что уровень общего IgG во всех исследуемых образцах со слизистых оболочек имел статистически значимую прямую взаимосвязь с концентрацией специфических IgG против SARS-CoV-2 сыворотки крови.

Отдаленные изменения в гуморальном иммунном ответе слизистых оболочек, которые имели наиболее выраженный характер, выявлены у медицинских работников, перенесших заболевание в тяжелой и среднетяжелой формах.

Ключевые слова: мукозальный иммунитет, секреторный иммуноглобулин A, COVID-19, SARS-CoV-2, гуморальный иммунитет, иммуноглобулин G

MUCOSAL HUMORAL IMMUNE RESPONSE OF RESPIRATORY TRACT IN MEDICAL WORKERS DURING THE POST-COVID-19 PERIOD

Kryukova N.O.^a, Khasanova A.A.^b, Baranova I.A.^a, Kostinov M.P.^{c, d}, Svitich O.A.^c, Chuchalin A.G.^a

^a N. Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russian Federation

^b Ulyanovsk State University, Ulyanovsk, Russian Federation

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

^d First Moscow State I. Sechenov Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation

Abstract. Currently, the role of local respiratory tract immunoglobulins in COVID-19 and rearrangement of mucosal immune response in the post-COVID period have not been sufficiently studied. Our aim was to evaluate long-term effects of novel coronavirus infection on the mucosal immunity in healthcare workers over the post-infection period.

A total of 180 healthcare workers, ranging in age from 18 to 65 years, were enrolled in a one-stage, cross-sectional study. The subjects with a history of COVID-19 were divided into three groups, depending on the severity of their disease. The control group consisted of 44 healthcare workers who had no history of novel coronavirus infection. Secretory immunoglobulin A (sIgA) and total immunoglobulin G (IgG) levels were quantified in saliva samples, induced sputum samples, naso- and oropharyngeal scrapings by ELISA technique. Specific anti-SARS-CoV-2 IgG antibodies were quantified in the serum by chemiluminescence immunoassay.

Numerous shifts in adaptive immune response were detected for different mucosal compartments, i.e., in subjects who suffered from severe or moderate-to-severe COVID-19, salivary sIgA levels were significantly higher than those in the control group ($p < 0.05$ and $p < 0.005$, respectively). An inverse correlation was demonstrated between the levels of total sIgA in all mucosal sites, and the number of days from the onset of disease to the start of study ($r = 0.278$, $p < 0.05$). When compared to the control subjects, all the patients with prior COVID-19 had significantly higher levels of total IgG in the induced sputum samples. Total IgG in saliva was also higher in the group of patients who had severe infection ($p < 0.05$). By contrast, IgG levels in nasopharyngeal samples were decreased in severe and moderately severe groups compared to the control group, thus, probably, indicating an immunodeficiency state in these cases. A direct significant correlation was also detected between the levels of total IgG in all studied samples and the levels of specific IgG antibodies against SARS-CoV-2 in the serum.

Long-term changes in the humoral mucosal immune response were most pronounced in the healthcare workers with a history of severe or moderate-to-severe COVID-19.

Keywords: mucosal immunity, secretory immunoglobulin A, COVID-19, SARS-CoV-2, humoral immunity, immunoglobulin G

Введение

Широко известна роль антител в нейтрализации вируса и обеспечении защиты организма от повторного заражения. Гуморальный иммунитет против SARS-CoV-2 активно изучался в основном на системном уровне у пациентов с новой коронавирусной инфекцией (COVID-19) как в острую фазу, так и в период реконвалесценции.

Появление антител сопровождается постепенным снижением вирусной нагрузки. Однако, известно, что сывороточные антитела могут нейтрализовать вирус в крови, что недостаточно для элиминации патогена [1]. SARS-CoV-2 в первую очередь поражает верхние дыхательные пути. Инициация иммунного ответа осуществляется в слизистых оболочках носа и ротоглотки, в первую очередь посредством секретируемых неспецифических факторов врожденного иммунитета, однако для элиминации вируса необходимы адаптивные механизмы иммунной защиты — локальные иммуноглобулины [8, 9, 10, 11].

Секреторный иммуноглобулин А представляет собой основной класс антител, присутствующих на поверхностях слизистых оболочек и продуцируемых местными плазматическими клетками в основном в виде димерного IgA. Он обладает защитными свойствами против разных патогенов, включая вирусы, за счет нейтрализующих свойств, возможности препятствовать адгезии на поверхности слизистой, а также проникновению в эпителиальные клетки за счет опсонизации патогенных микроорганизмов [12]. Предварительные исследования показали, что у взрослых лиц в острой фазе COVID-19 в секрете слюнных желез определяются высокие уровни специфических нейтрализующих sIgA [4, 10, 13, 14]. На поверхностях слизистых оболочек верхних дыхательных путей также обнаруживаются IgG, проникающие в основном из системного кровотока путем пассивного перемещения в области эпителия десневой борозды, однако некоторые из них синтезируются локально [5]. Известно, что данный класс иммуноглобулинов обладает высоким аффинитетом, участвует в привлечении фагоцитов и натуральных киллеров, активизирует систему комплемента, блокирует активные центры патогенов и нейтрализует токсины [3]. В настоящее время недостаточно исследований, посвященных изучению изменений локального иммунного ответа на участках слизистых дыхательных путей, в частности защитной роли sIgA и IgG после заболевания COVID-19.

Целью настоящего исследования было изучить влияние перенесенной новой коронавирусной

инфекции на гуморальные факторы мукозального иммунитета у медицинских работников.

Материалы и методы

В одномоментное поперечное исследование были включены 180 медицинских работников в возрасте от 18 до 65 лет (21 мужчин и 159 женщин), перенесших новую коронавирусную инфекцию в период с апреля 2020 г. по май 2021 г. и неболевших 136 человек с COVID-19 в анамнезе были разделены в зависимости от степени тяжести перенесенного заболевания [2] на три группы: 1) тяжелого течения (n = 16); 2) среднетяжелого течения (n = 71); 3) легкого и бессимптомного течения заболевания (n = 49). Контрольную группу составили 44 медицинских работника, не болевших COVID-19.

Визит № 0 (день 0)

Все участники исследования подписали добровольное информированное согласие, отвечающее требованиям, изложенным в Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации (2013), всеобщей декларации о биоэтике и правах человека от 19.10.2005 г., всеобщей декларации прав человека (принята Генеральной Ассамблеей ООН 10.12.1948). Протокол исследования был одобрен локальным комитетом по этике ФГАОУ ВО «РНИМУ им. Н.И. Пирогова» Минздрава России.

Визит № 1 (день 1)

В этот день проводилась оценка клинического статуса, включающая подробный сбор жалоб и медицинского анамнеза, физикальный осмотр, оценивался индекс коморбидности по Charlson. Осуществлялся забор образцов слюны, соскобов эпителиальных клеток со слизистых носоглотки. Образцы индуцированной мокроты получали после ингаляций стерильным гипертоническим раствором 5% NaCl не более 30 мин согласно стандартизированной методике [6].

Для определения концентрации иммуноглобулинов в секретах слизистых оболочек были использованы наборы «IgA секреторный-ИФА-БЕСТ» и «IgG общий-ИФА-БЕСТ» для твердофазного иммуноферментного анализа (АО «Вектор-Бест», г. Новосибирск), основанного на двухстадийном «сэндвич»-методе с применением моноклональных антител к IgG и к секреторному компоненту, связанному с α -цепью IgA. Исследования осуществлялись строго в соответствии с протоколом фирмы-производителя.

Статистический анализ проводился с применением пакета прикладных программ IBM SPSS Statistics 23 (США) с использованием параметрических и непараметрических методов. В зависимости от вида распределения мерами централь-

ной тенденции и рассеяния служили: среднее значение и среднее квадратическое (стандартное) отклонение ($M \pm SD$) или медиана и 25-й; 75-й процентиля – $Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})$. Взаимосвязь двух признаков между собой оценивалась с помощью корреляционного анализа по Спирмену.

Результаты и обсуждение

Клиническая характеристика исследуемых групп

Исследование было проведено спустя $135,1 \pm 73,2$ дня от момента появления первых симптомов заболевания. Клинические параметры участников исследования представлены в таблице 1.

Медицинские работники, перенесшие новую коронавирусную инфекцию в тяжелой и среднетяжелой формах, были старше, имели более высокий индекс массы тела и индекс коморбидности по Charlson по сравнению с лицами групп легкого, бессимптомного течения и неболевшими, что согласуется с основными факторами риска тяжелого течения инфекции.

Результаты лабораторных исследований

Концентрации sIgA на различных участках слизистых оболочек и секретов представлены в таблице 2. В группах, перенесших тяжелую и среднетяжелую форму COVID-19, концентрация sIgA в образцах секрета слюнных желез была значимо выше по сравнению с контрольной группой. Недостойное увеличение sIgA также было определено в образцах, полученных из ротоглотки, и в индуцированной мокроте у лиц из тех же групп в сравнении с контролем.

Выявлена прямая корреляция слабой силы между уровнем sIgA ротоглотки и sIgA носоглотки ($r = 0,171, p < 0,05$), а также sIgA ротоглотки и sIgA секрета слюнных желез ($r = 0,226, p < 0,05$). Определена прямая связь между концентрациями sIgA индуцированной мокроты и секрета слюнных желез ($r = 0,375, p < 0,01$). Уровень общего sIgA на всех участках слизистых оболочек обратно коррелировал с числом дней от начала заболевания до проведения исследования ($r = 0,278, p < 0,05$).

Результаты исследования общего IgG в различных образцах представлены в таблице 3. У всех переболевших определено значимое повышение концентрации данного иммуноглобулина в образцах индуцированной мокроты по сравнению с контрольной группой. В группе тяжелого течения заболевания также отмечалось достоверное увеличение концентрации общего IgG в образцах секрета слюнных желез. Напротив, в носоглотке у лиц, перенесших заболевание в тяжелой и среднетяжелой формах, наблюдалось снижение данного титра в сравнении с группами легкого, бессимптомного течения и неболевшими.

При анализе корреляционной зависимости между значениями sIgA и IgG была выявлена прямая корреляция между концентрацией sIgA и концентрацией IgG в одних и тех же участках слизистых, а также в секретах желез верхних и средних дыхательных путей ($p < 0,05$). Также отмечено, что уровень общего IgG ротоглотки, носоглотки, индуцированной мокроты и слюны на всех участках слизистых оболочек имел прямую взаимосвязь с концентрацией специфических IgG сыворотки крови против SARS-CoV-2 сыворотки

ТАБЛИЦА 1. КЛИНИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ИССЛЕДУЕМЫХ ГРУПП

TABLE 1. CLINICAL CHARACTERISTICS OF THE STUDIED GROUPS

Группа Group	Параметр Parameter	Возраст Age	ИМТ BMI	Индекс Charlson $Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})$ Charlson index $Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})$
Тяжелое течение Severe disease		$55,1 \pm 6,3^{**}$	$32,4 \pm 3,8^{**}$	2 (1-3)*
Среднетяжелое Moderate-to-severe disease		$52,2 \pm 10,2^{**}$	$29,2 \pm 6,1$	1 (2-1)*
Легкое / бессимптомное Mild or asymptomatic disease		$39,5 \pm 13,2$	$27,6 \pm 6,8$	0 (0-1)
Неболевшие COVID-19 No history of COVID-19		$44,9 \pm 13,2$	$28,2 \pm 6,5$	1 (0-2)

Примечание. * $p < 0,05$ – в сравнении с группами легкого/бессимптомного течения и неболевших COVID-19; ** $p < 0,005$ – в сравнении с группами легкого / бессимптомного течения и неболевших COVID-19.

Note. * $p < 0.05$, in comparison with groups of mild or asymptomatic disease and with no history of COVID-19; ** $p < 0.005$, in comparison with groups of mild or asymptomatic disease and with no history of COVID-19.

ТАБЛИЦА 2. ПОКАЗАТЕЛИ ОБЩЕГО СЕКРЕТОРНОГО ИММУНОГЛОБУЛИНА А НА УЧАСТКАХ СЛИЗИСТЫХ ОБОЛОЧЕК И В СЕКРЕТАХ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ТЯЖЕСТИ ПЕРЕНЕСЕННОГО COVID-19, мкг/мл

TABLE 2. INDICATORS OF TOTAL SECRETORY IMMUNOGLOBULIN A IN AREAS OF MUCOUS MEMBRANES AND IN SECRETS, DEPENDING ON THE SEVERITY OF PRIOR COVID-19, µg/mL

Группа Group	Тяжелое течение Severe disease	Среднетяжелое течение Moderate-to-severe disease	Легкое, бессимптомное течение Mild or asymptomatic disease	Неболевшие COVID-19 No history of COVID-19
Локализация Localization				
Ротоглотка Oropharynx	20,5 (15,1-28,9)	12,4 (2,6-23,5)	8,9 (2,3-22,6)	6,5 (1,1-14,2)
Носоглотка Nasopharynx	40,4 (18,3-70,9)	33,0 (19,8-56,0)	48,8 (21,4-58,2)	29,9 (19,2-58,2)
Индукцированная мокрота Induced sputum	73,2 (23,3-85,5)	64,5 (37,8-86,7)	45,0 (11,2-83,2)	42,9 (13,1-69,0)
Секрет слюнных желез Salivary gland secretions	80,0 (71,6-121,8)*	95,8 (78,4-139,3)**	78,8 (49,8-99,7)	71,1 (54,2-111,9)

Примечание. * $p < 0,05$ – в сравнении с контрольной группой, ** $p < 0,005$ – в сравнении с контрольной группой.

Note. * $p < 0.05$, compared to the control group; ** $p < 0.005$, compared to the control group.

ТАБЛИЦА 3. ПОКАЗАТЕЛИ ОБЩЕГО IgG НА УЧАСТКАХ СЛИЗИСТЫХ ОБОЛОЧЕК И В СЕКРЕТАХ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ТЯЖЕСТИ ПЕРЕНЕСЕННОГО COVID-19, мкг/мл

TABLE 3. INDICATORS OF TOTAL IgG IN THE AREAS OF MUCOUS MEMBRANES AND IN SECRETS, DEPENDING ON THE SEVERITY OF PRIOR COVID-19, µg/mL

Группа Group	Тяжелое течение Severe disease	Среднетяжелое течение Moderate-to-severe disease	Легкое, бессимптомное течение Mild or asymptomatic disease	Неболевшие COVID-19 No history of COVID-19
Локализация Localization				
Ротоглотка Oropharynx	0,012 (0,008-0,101)	0,014 (0,0090-0,01540)	0,009 (0,007-0,068)	0,008 (0,007-0,034)
Носоглотка Nasopharynx	0,040 (0,018-0,259)*	0,023 (0,009-0,084)**	0,208 (0,047-0,366)	0,115 (0,027-0,175)
Индукцированная мокрота Induced sputum	0,082 (0,057-0,209)**	0,096 (0,069-0,139)**	0,078 (0,042-0,097)*	0,018 (0,005-0,057)
Секрет слюнных желез Salivary gland secretions	0,182 (0,107-0,640)*	0,079 (0,012-0,168)	0,070 (0,025-0,135)	0,053 (0,018-0,1240)

Примечание. См. примечание к таблице 2.

Note. As for Table 2.

крови ($r = 0,320$, $r = 0,296$, $r = 0,475$ и $r = 0,390$, $p < 0,05$ соответственно). В отличие от sIgA не было выявлено взаимосвязи между концентрацией IgG в различных образцах слизистых в зависимости от времени перенесенного заболевания до проведения исследования, однако это может быть связано с постепенным увеличением концентрации данного иммуноглобулина с течением

времени от начала заболевания с постепенным снижением показателя в течение трех месяцев [7].

В наше исследование были включены медицинские работники, которые относятся к группе высокого риска заражения новой коронавирусной инфекцией, бессимптомного носительства вируса и, как следствие, инфицирования пациентов и коллег.

Лица группы тяжелого и среднетяжелого течения были старше, с более высокими показателями ИМТ и коморбидности, что согласуется с основными факторами, увеличивающими риск тяжелого течения COVID-19 [2].

Показатель общего SIgA определялся в повышенной концентрации у лиц тяжелого и среднетяжелого течения COVID-19 в секрете слюнных желез в сравнении с контрольной группой, а в образцах ротоглотки и индуцированной мокроты прослеживалась недостоверная тенденция к повышению антител в тех же группах.

Возможно данные изменения можно объяснить наличием доли специфического иммуноглобулина против SARS-CoV-2. Исследование специфических sIgA против SARS-Cov-2 было проведено в ряде работ. Например, Isho B. и соавт. выявили увеличение sIgA к рецептор-связывающему домену S-белка в образцах слюны у пациентов с COVID-19 спустя длительный период после выздоровления (до 115 дней) в сравнении с контрольной группой [7]. Как и в нашем исследовании, уровень секреторного иммуноглобулина А в секрете слюнных желез снижался со временем. Кроме того, авторы данной работы не выявили сильной корреляции между концентрациями IgA в крови и в слюне, что указывало на разграничение IgA-ответа в ротовой полости и на системном уровне.

Нами было выявлено, что в отличие от sIgA общий IgG был повышен не только в секрете слюнных желез, но также в образцах индуцированной мокроты у пациентов, перенесших COVID-19 в тяжелой и среднетяжелой формах, что согласуется с данными Isho B. и соавт., которые показали, что уровни IgG против SARS-CoV-2 имеют сильную корреляционную связь в парных образцах

сыворотки и слюны, что указывает на возможное использование слюны для мониторинга иммунного ответа против инфекции и оценки напряженности иммунитета слизистых, не прибегая к более дорогостоящим методикам [7]. Концентрация IgG также коррелировала с показателями sIgA на аналогичных участках слизистых и с уровнем антител IgG против вируса SARS-CoV-2. Не было выявлено взаимосвязи между уровнями IgG в соскобах со слизистых верхних дыхательных путей и в секретах с количеством дней от начала заболевания, однако следует напомнить, что специфических мукозальных антител в нашей работе не определялись.

Интересно, что в носоглотке, напротив, отмечались пониженные титры IgG в группах тяжелого течения. Слизистая оболочка носа относится к входным воротам новой коронавирусной инфекции. Нами было выявлено, что в случае легкой формы заболевания или при бессимптомном течении показатель иммуноглобулина достоверно увеличивается в два раза, что говорит о стойкой защите от повторного заражения. В случае, когда пациенты перенесли COVID-19 в тяжелой или среднетяжелой формах, наблюдается 3- или 5-кратное снижение исследуемого показателя, что может свидетельствовать об иммунодефицитном состоянии у данных пациентов.

Заключение

Наше исследование выявило длительные изменения гуморального иммунного ответа слизистых оболочек в отдаленном постковидном периоде, которые имели наиболее выраженный характер у медицинских работников, перенесших заболевание в тяжелой и среднетяжелой формах.

Список литературы / References

1. Временное руководство по лабораторной диагностике COVID-19 в условиях пандемии: Методические рекомендации № 89. М.: ГБУ «НИИОЗММ ДЗМ». [Interim guidance on laboratory diagnosis of COVID-19 in a pandemic: Guidelines No. 89] Moscow: GBU "NIIOZMM DZM".
2. Камкин Е.Г., Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19). Временные методические рекомендации. М.: Министерство Здравоохранения Российской Федерации, 2020. [Kamkin, E. G. Prevention, Diagnosis and Treatment of Novel Coronavirus Infection (COVID-19). Temporary Guidelines. Ministry of Health of the Russian Federation, 2020.
3. Респираторная медицина: руководство: в 3 т. / Под ред. А.Г. Чучалина. 2-е изд., перераб. и доп. М.: Литтера, 2017. Т. 1. С. 148. [Respiratory Medicine: A Manual in 3 Volumes., Ed. A. Chuchalin. 2nd ed., revised and additional]. Moscow: Littera, 2017, Vol. 1, P. 148.
4. Aita A., Basso D., Cattelan A.M., Fioretto P., Navaglia F., Barbaro F., Stoppa A., Coccorullo E., Farella A., Socal A., Vettor R., Plebania M. SARS-CoV-2 identification and IgA antibodies in saliva: One sample two tests approach for diagnosis. *Clin. Chim. Acta*, 2020, Vol. 510, pp. 717-722.
5. Brandtzaeg P. Secretory immunity with special reference to the oral cavity. *J. Oral Microbiol.*, 2013. Vol. 5. doi: 10.3402/jom.v5i0.20401.

6. Guiot J, Demarche S, Henket M, Paulus V, Graff S, Schleich F, Corhay J.-L., Louis R., Moermans C. Methodology for sputum induction and laboratory processing. *J. Vis. Exp.*, 2017, Vol. 130, 56612. doi: 10.3791/56612.
7. Isho B., Abe K.T., Zuo M., Jamal A.J., Rathod B., Wang J.H., Li Z., Chao G., Rojas O.L., Bang Y.M., Pu A., Christie-Holmes N., Gervais C., Ceccarelli D., Samavarchi-Tehrani P., Guvenc F, Budyłowski P, Li A., Paterson A., Yue F.Y., Marin L.M., Caldwell L., Wrana J.L., Colwill K., Sicheri F, Mubareka S., Gray-Owen S.D., Drews S.J., Siqueira W.L., Barrios-Rodiles M., Ostrowski M., Rini J.M., Durocher Y., McGeer A.J., Gommerman J.L., Gingras A. C. Persistence of serum and saliva antibody responses to SARS-CoV-2 spike antigens in COVID-19 patients. *Sci. Immunol.*, 2020, Vol. 5, no. 52, eabe5511. doi: 10.1126/sciimmunol.abe5511.
8. Chao Y.X., Röttschke O., Tan E.K. The role of IgA in COVID-19. *Brain Behav. Immun.*, 2020, Vol. 87, pp. 182-183.
9. Cervia C., Nilsson J., Zurbuchen Y., Valaperti A., Schreiner J., Wolfensberger A., Raeber M.E., Adamo S., Weigang S., Emmenegger M., Hasler S., Bosshard P.P., de Cecco E., Bächli E., Rudiger A., Stüssi-Helbling M., Huber L.C., Zinkernagel A.S., Schaer D.J., Aguzzi A., Kochs G., Held U., Probst-Müller E., Rampini S.K., Boyman O. Systemic and mucosal antibody responses specific to SARS-CoV-2 during mild versus severe COVID-19. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2021, Vol. 147, no. 2, pp. 545-557.
10. Pearson C.F., Jeffery R. Mucosal immune responses in COVID19 – a living review. *Oxf. Open Immunol.*, 2021. Vol. 2, no. 1, iqab002. doi: 10.1093/oxfimm/iqab002.
11. Fröberg J., Diavatopoulos D.A. Mucosal immunity to severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 infection. *Curr. Opin. Infect. Dis.*, 2021. Vol. 34, no. 3, pp. 181-186.
12. Russell M. Biological activities of mucosal immunoglobulins. In: J. Mestecky, W. Strober, M.W. Russell, B.L. Kelsall, H. Cheroutre, B.N. Lambrecht, editors. *Mucosal Immunology*, 4. Amsterdam: Academic Press/Elsevier 2015, pp. 429-454.
13. Roda A., Cavallera S., di Nardo F., Calabria D., Rosati S., Simoni P., Colitti B., Baggiani C., Roda M., Anfossi L. Dual lateral flow optical/chemiluminescence immunosensors for the rapid detection of salivary and serum IgA in patients with COVID-19 disease. *Biosens. Bioelectron.*, 2021. Vol. 172, 112765. doi: 10.1016/j.bios.2020.112765.
14. Pisanic N., Randad P.R., Kruczynski K., Manabe Y.C., Thomas D., Pekosz A., Klein S.L., Betenbaugh M.J., Clarke W.A., Laeyendecker O., Caturegli P.P., Larman H.B., Detrick B., Fairley J.K., Sherman A.C., Roupheal N., Edupuganti S., Granger D.A., Granger S.W., Collins M., Heaney C.D. COVID-19 Serology at Population Scale: SARS-CoV-2-Specific Antibody Responses in Saliva. *J. Clin. Microbiol.*, 2020, Vol. 59, no. 1, e02204-20. doi: 10.1128/JCM.02204-20.

Авторы:

Крюкова Н.О. – ассистент, аспирант кафедры госпитальной терапии педиатрического факультета ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Хасанова А.А. – аспирант кафедры инфекционных болезней ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный университет», г. Ульяновск, Россия

Баранова И.А. – д.м.н., профессор кафедры госпитальной терапии педиатрического факультета ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Authors:

Kryukova N.O., Postgraduate Student, Assistant Professor, Department of Hospital Therapy, Pediatric Faculty, N. Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russian Federation

Khasanova A.A., Postgraduate Student, Department of Infectious Diseases, Ulyanovsk State University, Ulyanovsk, Russian Federation

Baranova I.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Hospital Therapy, N. Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russian Federation

Костинов М.П. — д.м.н., профессор, член-корр. РАН, заведующий кафедрой эпидемиологии и современных технологий вакцинации ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ (Сеченовский университет); заведующий лабораторией вакцинопрофилактики и иммунотерапии аллергических заболеваний ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

Свитич О.А. — д.м.н., член-корр. РАН, директор ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова»; профессор кафедры иммунологии МБФ ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Чучалин А.Г. — д.м.н., профессор, академик РАН, кафедра госпитальной терапии педиатрического факультета ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Kostinov M.P., PhD, MD (Medicine), Professor, Corresponding Member, Russian Academy of Sciences, Head, Department of Epidemiology and Modern Technologies of Vaccination, First Moscow State I. Sechenov Medical University (Sechenov University); Head, Laboratory of Vaccine Prophylaxis and Immunotherapy of Allergy, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

Svitich O.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Corresponding Member, Russian Academy of Sciences, Director, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera; Professor, Department of Immunology, N. Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russian Federation

Chuchalin A.G., PhD, MD (Medicine), Professor, Full Member, Russian Academy of Sciences, Head, Department of Hospital Therapy, N. Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russian Federation

Поступила 10.07.2023
Принята к печати 12.07.2023

Received 10.07.2023
Accepted 12.07.2023

ФОРМИРОВАНИЕ ПОДХОДОВ К ИММУНОКОРРЕКЦИИ НАРУШЕНИЙ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ У ПОСТКОВИДНЫХ ПАЦИЕНТОВ

Добрынина М.А.^{1,2,5}, Зурочка А.В.^{1,3}, Зурочка В.А.^{1,3}, Рябова Л.В.⁴,
Сарапульцев А.П.^{1,3}

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

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

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

⁴ ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства
здравоохранения РФ, г. Челябинск, Россия

⁵ ФБУН ФНИИВИ «ВИРОМ» Роспотребнадзора, г. Екатеринбург, Россия

Резюме. Вирус SARS-CoV-2 способен формировать различные нарушения иммунной системы у постковидных пациентов. При этом эти нарушения могут сохраняться длительно более 6–12 месяцев после острой фазы заболевания. Поэтому поиск подходов к иммунокоррекции выявленных нарушений является одной из серьезных проблем современной клинической иммунологии.

Целью исследования явилось изучение влияния синтетического пептида активного центра ГМ-КСФ на состояние иммунной системы пациентов с «постковидным синдромом» иммунопатологии.

Было обследовано 21 пациент, перенесший SARS-CoV-2-инфекцию. Методом проточной цитометрии определены CD45⁺ и CD46⁺ (панлейкоцитарный маркер для гейтирования лимфоцитов), CD45⁺ и CD46⁺, CD3⁺ (Т-лимфоциты), CD45⁺ и CD46⁺, CD3⁺, CD4⁺ (хелперы-индукторы), 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⁺ (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). Общие и специфические к SARS-CoV-2 IgA, IgM, IgG, фагоцитоз и НСТ-активность нейтрофилов, фрагменты компонента C1q, C3a, C5a.

Исследования показали, что местное применение на слизистых синтетического пептида активного центра ГМ-КСФ (Ацеграм-спрей) достоверно влияет преимущественно на функциональную бактерицидную активность нейтрофилов (НСТ-активность), увеличивает процент Т-хелперов и C3a

Адрес для переписки:

Добрынина Мария Александровна
ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии»
Уральского отделения Российской академии наук
620049, Россия, Екатеринбург, ул. Первомайская, 106
Тел.: 8 (982) 340-40-00.
E-mail: mzurochka@mail.ru

Address for correspondence:

Maria A. Dobrynina
Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch,
Russian Academy of Sciences
106 Pervomaiskaya St
Yekaterinburg
620049 Russian Federation
Phone: +7 (982) 340-40-00.
E-mail: mzurochka@mail.ru

Образец цитирования:

М.А. Добрынина, А.В. Зурочка, В.А. Зурочка,
Л.В. Рябова, А.П. Сарапульцев «Формирование
подходов к иммунокоррекции нарушений иммунной
системы у постковидных пациентов» // Российский
иммунологический журнал, 2023. Т. 26, № 4. С. 641-646.
doi: 10.46235/1028-7221-13492-ATC

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

For citation:

M.A. Dobrynina, A.V. Zurochka, V.A. Zurochka,
L.V. Ryabova, A.P. Sarapultsev "Approaches to correction
of immune system disturbances in post-COVID patients",
Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii
Zhurnal, 2023, Vol. 26, no. 4, pp. 641-646.
doi: 10.46235/1028-7221-13492-ATC

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

DOI: 10.46235/1028-7221-13492-ATC

фрагмент комплемента. Все это свидетельствует о том, что синтетический пептид активного центра ГМ-КСФ влияет преимущественно на врожденные факторы иммунитета. Остальные показатели иммунной системы не имели достоверных отличий. Отсутствие влияния на другие компартменты иммунной системы говорит о том, что формирование подходов к терапии постковидных пациентов с нарушением иммунной системы требует поиска дополнительных иммуномодуляторов, влияющих в том числе и на Т-, В- и NK-клетки. Все это требует продолжения исследований по поиску влияния различных иммуномодуляторов на иммунную систему «постковидных пациентов».

Ключевые слова: иммунная система, Т-клетки, Т-лимфоциты, нейтрофилы, пептид активного центра ГМ-КСФ, SARS-CoV-2-инфекция, постковидные пациенты

APPROACHES TO CORRECTION OF IMMUNE SYSTEM DISTURBANCES IN POST-COVID PATIENTS

Dobrynina M.A.^{a, b, e}, Zurochka A.V.^{a, c}, Zurochka V.A.^{a, c}, Ryabova L.V.^d, Sarapultsev A.P.^{a, c}

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

^b Federal A. Burnazyan Medical Biophysical Research Center, Moscow, Russian Federation

^c South Ural State University (National Research University), Chelyabinsk, Russian Federation

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

^e Federal Research Institute of Viral Infections "VIROM", Yekaterinburg, Russian Federation

Abstract. SARS-CoV-2 virus can induce immune system disorders in post-COVID patients, which may persist for an extended period beyond the acute phase of the disease. Therefore, the search for immunocorrection approaches to address the detected disorders is a significant challenge in clinical immunology. This study aimed to investigate the impact of a synthetic peptide derived from the active center of GM-CSF on the immune system of patients with post-COVID immunopathological syndrome. A total of 21 patients who previously suffered with SARS-CoV-2 infection were included in the study. Flow cytometry was used to analyze various immune cell populations, including panleukocyte markers for gated lymphocytes (CD45⁺ and CD46⁺), T lymphocytes (CD3⁺), helper inducers (CD3⁺, CD4⁺), cytotoxic T lymphocytes (CD3⁺, CD8⁺), TNK cells (CD3⁺, CD56⁺), natural killer cells (CD3⁻, CD56⁺), B lymphocytes (CD3⁻, CD19⁺), activated helper cells (CD3⁺, CD4⁺, CD25⁺), and activated T lymphocytes (CD3⁺, HLA-DR). Moreover, IgA, IgM, IgG antibodies specific to SARS-CoV-2, phagocytosis and NBT activity of neutrophils, and complement fragments C1q, C3a, and C5a were assessed. The results demonstrated that topical application of the synthetic peptide derived from the active center of GM-CSF (Acegram-spray) upon mucous membranes significantly influenced the functional bactericidal activity of neutrophils (NBT-activity), increased the percentage of T helper cells, and elevated the C3a complement fragment. These findings indicate that the synthetic peptide primarily affects innate immunity factors. However, no significant differences were observed in other immune system parameters. Therefore, the development of therapeutic approaches for post-COVID patients with impaired immune systems may require a search for additional immunomodulators that target T, B, and NK cells. Further research is needed to explore the effects of various immunomodulators on the immune system of post-COVID patients.

Keywords: immune system, T cells, T lymphocytes, neutrophils, GM-CSF active site peptide, SARS-CoV-2 infection, post-COVID patients

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.

Введение

После острой SARS-CoV-2-инфекции у пациентов через 6-12 месяцев формируется пост-

ковидный синдром, часто сопровождающийся развитием тех или иных нарушений иммунной системы [1, 2, 3, 10]. Как было показано авторами у пациентов с постковидным синдромом выявляются нарушения Т-, В-, NK-клеток, фагоцитов, комплемента. Практически «посковидный синдром» иммунодефицита проявляется нарушениями во всех звеньях иммунной системы. Это связано скорее всего с тем, что развитие острого процесса SARS-CoV-2 инфекции сопровождается повреждением практически всех компар-

тментов иммунной системы и в первую очередь Т-лимфоцитов [11, 12]. При этом именно нарушение иммунной системы оказывается критичным в случае SARS-CoV-2, поскольку сверхактивный цитокиновый ответ, типичный для тяжелых случаев заболевания, приводит к развитию системных осложнений, полиорганной недостаточности и, в конечном итоге, к смерти [13, 14, 15]. В то же время нарушения иммунной системы, отмечающиеся у постковидных пациентов, требуют разработки подходов к их иммунокоррекции. Одним из таких подходов является применение синтетического пептида активного центра ГМ-КСФ, успешно применявшегося при различных патологических состояниях, в том числе при патологиях, связанных с нарушениями в иммунной системе человека [4].

Работ, посвященных иммунокоррекции нарушений иммунной системы у постковидных пациентов, в доступной литературе обнаружено не было.

Однако получение фундаментальных знаний об иммунокоррекции у постковидных пациентов являются крайне востребованными, так как могут позволить разработать новые подходы к лечению и реабилитации больных, в том числе и при иных вирусных (в том числе и сезонных) заболеваниях.

Таким образом, учитывая роль иммунной системы в формировании нарушений у постковидных пациентов мы изучили возможность применения у таких больных синтетического пептида активного центра ГМ-КСФ.

Цель исследования – изучить влияния синтетического пептида активного центра ГМ-КСФ на состояние иммунной системы пациентов с «постковидным синдромом» иммунопатологии.

Материалы и методы

Было обследовано 20 пациентов, перенесших SARS-CoV-2 инфекцию. Критерием включения в группы исследований были: подтвержденный диагноз SARS-CoV-2 инфекции методом полимеразной цепной реакции (ПЦР), наличие IgA, IgM, IgG к вирусу SARS-CoV-2 инфекции, данные компьютерной томографии о перенесенной пневмонии. Исследование проводилось не менее чем через 6-12 месяцев после перенесенной пневмонии вызванной SARS-CoV-2 инфекцией.

Все пациенты были предварительно обследованы врачом-терапевтом и иммунологом-аллергологом для выявления сопутствующих заболеваний. Группы были рандомизированы по полу, возрасту, сопутствующим заболеваниям по критерию χ^2 . Пациенты были разделены на 2 группы сравнения по гейтированию панлейкоцитарными маркерами: 1. Пациенты с «постковидным синдромом» нарушений иммунной системы

до применения пептида ($n = 20$). 2. Пациенты с «постковидным синдромом» нарушений иммунной системы после применения пептида ($n = 20$). Критерием для лечения были выбраны пациенты, имеющие нарушения фагоцитарного звена иммунитета, как один из наиболее часто встречающихся повреждений иммунной системы у таких больных на фоне повреждения других компартментов иммунной системы [1, 2, 3, 10]. Пептид активного центра ГМ-КСФ применялся по стандартной схеме 3 раза в день в течение 10 дней в концентрации 20 мкг/мл путем орошения слизистой носоглотки из расчета 1,5 мл раствора в день (суточная доза 30 мкг/день, за весь курс 300 мкг). Схема лечения применялась ранее у больных с герпетическими инфекциями [4, 5, 6, 7]. Все исследования были одобрены Независимым локальным этическим комитетом при ГАУЗ ОТКЗ «Городская клиническая больница № 1» г. Челябинска, протокол № 8 от 11.04.2022, на базе которой проводились данные исследования.

Иммунологические исследования

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).

Методом проточной цитометрии CD45⁺ и CD46⁺ (панлейкоцитарный маркер для гейтирования лимфоцитов), CD45⁺ и CD46⁺, CD3⁺ (Т-лимфоциты), CD45⁺ и CD46⁺, CD3⁺, CD4⁺ (хелперы-индукторы), 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), Beckman Coulter, BioLegend (США). Оценку иммунного статуса осуществляют методом проточной цитометрии на цитофлюориметре Navios (Beckman Coulter, США) по стандартизованной технологии оценки лимфоцитарного звена иммунитета [8, 9]. Оценивали стандартными общеизвестными методами общие и специфические к SARS-CoV-2 IgA, IgM, IgG, фагоцитоз и НСТ-активность нейтрофилов, фрагменты комплемента C1q, C3a, C5a.

Обработка и анализ данных осуществлялись с помощью R 3.1.1 12 (R Foundation for Statistical Computing, Вена, Австрия) и Microsoft Excel версии 14.0. Использовали критерии Стьюдента при параметрических данных и р-value теста Вилкоксона $< 0,05$), если критерии были непараметрическими.

ТАБЛИЦА 1. ПОКАЗАТЕЛИ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ ДО И ПОСЛЕ ПРИМЕНЕНИЯ СИНТЕТИЧЕСКОГО ПЕПТИДА АКТИВНОГО ЦЕНТРА ГМ-КСФ У ПОСТКОВИДНЫХ ПАЦИЕНТОВ

TABLE 1. PARAMETERS OF THE IMMUNE SYSTEM BEFORE AND AFTER THE USE OF THE SYNTHETIC ACTIVE SITE PEPTIDE GM-CSF IN POST-COVID PATIENTS

Показатели клеток иммунной системы Cells of the immune system	Группа 1. Постковидные пациенты до лечения пептидом Group 1. Post-COVID patients before peptide treatment n = 21 M±m	Группа 2. Постковидные пациенты после лечения пептидом Group 2. Post-COVID patients after peptide treatment n = 21 M±m
НСТ нейтрофилов спонтанная активность, отн. (%) NBT neutrophil spontaneous activity rel. (%)	14,600±2,657	22,250±2,657 p < 0,01
НСТ нейтрофилов спонтанная интенсивность, усл. ед. NBT neutrophils spontaneous intensity, conventional units	0,227±0,045	0,326±0,044 p < 0,02
НСТ нейтрофилов индуцированная активность, отн. (%) NBT neutrophil induced activity, rel. (%)	40,400±4,019	55,75±3,77 p < 0,01
НСТ нейтрофилов индуцированная интенсивность, усл. ед. NBT neutrophils induced intensity, conventional units	0,531±0,057	0,700±0,055 p < 0,05
Т-хелперы (CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD4 ⁺), отн. (%) T helpers (CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD4 ⁺) rel. (%)	41,470±1,947	47,62±2,32 p < 0,03
С3а-фрагмент комплемента, усл. ед. C3a complement fragment, conventional units	104,300±3,796	127,950±5,301 p < 0,001

Результаты и обсуждение

Результаты исследований показали, что местное применение на слизистых синтетического пептида активного центра ГМ-КСФ (Ацеграм-спрей) достоверно влияет преимущественного на функциональную бактерицидную активность нейтрофилов, увеличивает процент Т-хелперов и С3а-фрагмент комплемента (табл. 1). Остальные показатели иммунной системы не имели достоверных отличий.

Как показали наши исследования, синтетический пептид активного центра ГМ-КСФ влияет преимущественно на активность бактерицидной системы нейтрофилов (уровни спонтанной и индуцированной НСТ). При этом также увеличивают число Т-хелперов и активность классического пути активации комплемента (С3а). Все это свидетельствует о том, что пептид в основном действует на врожденные факторы иммунной системы, в то же время скорее всего через их активацию влияет и на Т-клеточное звено иммунной

системы у постковидных пациентов. Отсутствие влияния на другие компартменты иммунной системы говорит о том, что формирование подходов к терапии постковидных пациентов с нарушением иммунной системы требует поиска дополнительных иммуномодуляторов, влияющих в том числе и на Т-, В- и НК-клетки. Все это, конечно же, требует дополнительных исследований в данном направлении.

Выводы

1. Применение местно на слизистые оболочки (носоглотка) человека синтетического пептида активного центра ГМ-КСФ стимулирует спонтанную и индуцированную НСТ-активность нейтрофилов, С3а-фрагмента комплемента Т-хелперы.

2. Для восстановления других компартментов иммунной системы требуется дополнительные исследования различных иммуномодуляторов на состояние иммунной системы постковидных пациентов.

Список литературы / References

1. Добрынина М.А., Зурочка А.В., Комелькова М.В., Ло Ш. Исследование нарушения натуральных киллеров у пациентов, перенесших Covid-19 // Российский иммунологический журнал 2022. Т. 25, № 2. С. 161-166. [Dobrynina M.A., Zurochka A.V., Komelkova M.V., Lo Sh. Impairment of natural killer populations in the patients recovered from COVID-19. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2022, Vol. 25, no. 2, pp. 161-166. (In Russ.)] doi: 10.46235/1028-7221-1132-ION.
2. Добрынина М.А., Зурочка А.В., Комелькова М.В., Ло Ш., Зурочка В.А., Ху Д., Рябова Л.В., Сарапульцев А.П. Исследование экспрессии CD45⁺ 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., Khu D., Ryabova L.V., Sarapultsev A.P. Study of CD45⁺ and CD46⁺ expression on subpopulations of peripheral blood lymphocytes in 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. Добрынина М.А., Зурочка А.В., Комелькова М.В., Luo S., Семенова Д.А. Оценка взаимосвязи нарушения цитотоксических Т-лимфоцитов с другими компартментами иммунной системы у постковидных пациентов // Вестник уральской медицинской академической науки, 2022. Т. 19, № 3. С. 294-303. [Dobrynina M.A., Zurochka A.V., Komelkova M.V., Luo S., Semenova D.A. Evaluation of the relationship between the violation of cytotoxic T-lymphocytes and other compartments of the immune system in post-COVID patients. *Vestnik uralskoy meditsinskoy akademicheskoy nauki = Bulletin of the Ural Medical Academic Science*, 2022, Vol. 19, no. 3, pp. 294-303. (In Russ.)]
4. Зурочка А.В., Гриценко В.А., Зурочка В.А., Добрынина М.А., Черешнев В.А. Гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (ГМ-КСФ) и его синтетические аналоги: иммунологические эффекты и клиническое применение. Екатеринбург: УрО РАН, 2021. 288 с. [Zurochka A.V., Gritsenko V.A., Zurochka V.A., Dobrynina M.A., Chereshev V.A. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and its synthetic analogues: immunological effects and clinical applications]. Yekaterinburg: UB RAS, 2021. 288 p.
5. Забков О.И., Зурочка В.А., Добрынина М.А., Гриценко В.А., Зурочка А.В. Клинико-диагностические критерии эффективности комплексной этиопатогенетической терапии хронической Эпштейна–Барр вирусной инфекции // Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН, 2018. № 3. 12 с. [Zabkov O.I., Zurochka V.A., Dobrynina M.A., Gritsenko V.A., Zurochka A.V. Clinical and diagnostic criteria for the effectiveness of complex etiopathogenetic therapy for chronic Epstein-Barr virus infection. *Byulleten Orenburgskogo nauchnogo tsentra UrO RAN = Bulletin of the Orenburg Scientific Center of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences*, 2018, no. 3, 12 p. (In Russ.)]
6. Зурочка В.А., Забков О.И., Добрынина М.А., Гриценко В.А., Давыдова Е.В., Чукичев А.В., Забокрицкий Н.А., Сарапульцев А.П., Зурочка А.В. Иммунологические критерии эффективности комплексной этиопатогенетической терапии у больных хронической вирусной инфекцией, ассоциированной с вирусом Эпштейна–Барр // Инфекция и иммунитет, 2020. Т. 10, № 2. С. 338-346. [Zurochka V.A., Zabkov O.I., Dobrynina M.A., Gritsenko V.A., Davydova E.V., Chukichev A.V., Zabokritsky N.A., Sarapultsev A.P., Zurochka A.V. Immunological criteria for the effectiveness of complex etiopathogenetic therapy in patients with chronic viral infection associated with the Epstein-Barr virus. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2020, Vol. 10, no. 2, pp. 338-346. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-CDC-1141.
7. Зурочка А.В., Зурочка В.А., Добрынина М.А., Фомина Л.О., Забков О.И., Гриценко В.А. Иммунобиологические свойства синтетических аналогов гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ) // Российский иммунологический журнал, 2019. Vol. 13 (22), no. 2, pp. 778-780. [Zurochka A.V., Zurochka V.A., Dobrynina M.A., Fomina L.O., Zabkov O.I., Gritsenko V.A. Immunobiological properties of synthetic analogs of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF). *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2019, Vol. 13 (22), no. 2, pp. 778-780. (In Russ.)]. doi: 10.31857/S102872210006701-6.
8. 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]. Yekaterinburg: RIO Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, 2018. 720 p.
9. Хайдуков С.В., Байдун Л.А., Зурочка А.В., Тотолян А.А. Стандартизованная технология «Исследование субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови с применением проточных цитофлюориметров-анализаторов» // Российский иммунологический журнал, 2014. Т. 8 (17), № 4. С. 974-992. [Khaidukov S.V., Baidun L.A., Zurochka A.V., Totolyan A.A. Standardized technology "Study of the subpopulation composition of peripheral blood lymphocytes using flow cytometer-analyzers". *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2014, Vol. 8 (17), no. 4, pp. 974-992. (In Russ.)]
10. Dobrynina M.A., Ibragimov R.V., Kritsky I.S., Verkhovskaya M.D., Mosunov A.A., Sarapultsev G.P., Zurochka A.V., Zurochka V.A., Sarapultsev A.P., Komelkova M.V., Ryabova L.V., Praskurnichiy E.A. Post-COVID immunopatologysyndrome: characteristics of phenotypical changes in the immune system in post-COVID patients. *Medical Immunology (Russia)* 2023, Vol. 25, no. 4, pp. 791-796. doi: 10.15789/1563-0625-PCI-2707.
11. Gusev E., Sarapultsev A., Solomatina L., Chereshev V. SARS-CoV-2-specific immune response and the pathogenesis of COVID-19. *Int. J. Mol. Sci.*, 2022, Vol. 23, no. 3, 1716. doi: 10.3390/ijms23031716.

12. Jouan Y, Guillon A, Gonzalez L, Perez Y, Boisseau C, Ehrmann S, Ferreira M, Daix T, Jeannet R, François B, Dequin P.F, Si-Tahar M, Baranek T, Paget C. Phenotypical and functional alteration of unconventional T cells in severe COVID-19 patients. *J. Exp. Med.*, 2020, Vol. 217, no. 12, e20200872. doi: 10.1084/jem.20200872.
13. Le Fric G, Sheppard D, Whiteman P, Karsten C.M., Shamoun S.A., Laing A., Bugeon L., Dallman M.J., Melchionna T, Chillakuri C., Smith R.A., Drouet C., Couzi L, Fremeaux-Bacchi V, Köhl J, Waddington S.N., McDonnell J.M., Baker A., Handford P.A., Lea S.M., Kemper C. The CD46-Jagged1 interaction is critical for human TH1 immunity. *Nat. Immunol.*, 2012, Vol. 13, no. 12, pp. 1213-1221.
14. Masselli E., Vaccarezza M., Carubbi C., Pozzi G., Presta V., Mirandola P., Vitale M. NK cells: A double edge sword against SARS-CoV-2. *Adv. Biol. Regul.*, 2020, Vol. 77, 100737. doi: 10.1016/j.jbior.2020.100737.
15. Verdecchia P, Cavallini C., Spanevello A., Angelim F. The pivotal link between ACE2 deficiency and SARS-CoV-2 infection. *Eur. J. Intern. Med.*, 2020, Vol. 76, pp. 14-20.

Авторы:

Добрынина М.А. — к.м.н., научный сотрудник лаборатории иммунопатофизиологии ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук; старший научный сотрудник лаборатории трансмиссивных вирусных инфекций ФБУН ФНИИВИ «ВИРОМ» Роспотребнадзора, г. Екатеринбург; доцент 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 Российской Федерации, Москва, Россия

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

Зурочка В.А. — д.м.н., старший научный сотрудник лаборатории иммунопатофизиологии ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии», г. Екатеринбург; старший научный сотрудник лаборатории иммунобиотехнологии Российско-китайского центра ФГАОУ ВО «Южно-Уральский государственный университет (национальный исследовательский университет)», г. Челябинск, 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

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

Authors:

Dobrynina M.A., PhD (Medicine), Research Associate, Laboratory of Immunopathophysiology, Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences; Senior Research Associate, Laboratory of Transmissible Viral Diseases, Federal Research Institute of Viral Infections “VIROM”, Yekaterinburg; Associate Professor, Department of Therapy of the University of Innovation and Continuing Education, Federal A. Burnazyan Medical Biophysical Research Center, Moscow, Russian Federation

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

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

Поступила 02.07.2023
Принята к печати 12.07.2023

Received 02.07.2023
Accepted 12.07.2023

ПОЗИТИВНЫЕ ЭФФЕКТЫ РЕКОМБИНАНТНОГО ИНТЕРФЕРОНА $\alpha 2b$ НА ФЕНОТИП СУБПОПУЛЯЦИИ $CD16^+IFN\alpha/\beta R1^-CD119^+$, $CD16^+IFN\alpha/\beta R1^+CD119^-$ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ У ПАЦИЕНТОВ С ПОСТКОВИДНЫМ СИНДРОМОМ И ГЕРПЕСВИРУСНЫМИ ИНФЕКЦИЯМИ

Атажахова М.Г.¹, Нестерова И.В.^{1, 2}, Чудилова Г.А.¹,
Матушкина В.А.¹, Ковалева С.В.¹, Чапурина В.Н.¹

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

² ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы», Москва, Россия

Резюме. Постковидный синдром (ПКС) – мультисистемное воспалительное состояние, протекающее с проявлениями синдрома хронической усталости (СХУ) и когнитивных расстройств (КР), на фоне реактивации хронических герпесвирусных инфекций (ГВИ). Проявления ПКС требуют изучения молекулярных механизмов, связанных с продукцией IFN и рецепторной функцией нейтрофильных гранулоцитов (НГ), что является актуальным и представляет интерес, для поиска иммунотерапевтических стратегий у пациентов с ПКС. Цель – изучить эффекты влияния рекомбинантного интерферона $\alpha 2b$ (рекIFN $\alpha 2b$) *in vitro* на фенотип субпопуляций $CD16^+IFN\alpha/\beta R1^-CD119^+$, $CD16^+IFN\alpha/\beta R1^+CD119^-$ и функциональную активность НГ у пациентов с постковидным синдромом и герпесвирусными инфекциями.

Исследованы 45 пациентов (24-60 лет) с ПКС и ГВИ (ВПГ1, ВЭБ, ВЧГ6, ЦМВ) – группа исследования 1 (ГИ1). Проведено анкетирование с оценкой тяжести симптомов ПКС в баллах, исследование содержания и фенотипа субпопуляций НГ – $CD16^+IFN\alpha/\beta R1^-CD119^+$, $CD16^+IFN\alpha/\beta R1^+CD119^-$, $CD16^+IFN\alpha/\beta R1^+CD119^+$, фагоцитарная и NADPH-оксидазная функция НГ до инкубации и после инкубации *in vitro* с рекIFN $\alpha 2b$ (50 МЕ/мкл, 60 мин, T 37 °C) – группа исследования 1a (ГИ1a). Группа сравнения (ГС) 30 добровольцев обследованных в доковидный период.

Адрес для переписки:

Нестерова Ирина Вадимовна
ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов
имени Патриса Лумумбы»
117513, Россия, Москва, Ленинский пр., 123, кв. 1.
Тел.: 8 (916) 187-73-41.
E-mail: inesterova1@yandex.ru

Address for correspondence:

Irina V. Nesterova
P. Lumumba Peoples' Friendship University
123 Leninsky Ave, Apt 1
Moscow
117513 Russian Federation
Phone: +7 (916) 187-73-41.
E-mail: inesterova1@yandex.ru

Образец цитирования:

М.Г. Атажахова, И.В. Нестерова, Г.А. Чудилова,
В.А. Матушкина, С.В. Ковалева, В.Н. Чапурина
«Позитивные эффекты рекомбинантного интерферона
 $\alpha 2b$ на фенотип субпопуляции $CD16^+IFN\alpha/\beta R1^-$
 $CD119^+$, $CD16^+IFN\alpha/\beta R1^+CD119^-$ нейтрофильных
гранулоцитов у пациентов с постковидным синдромом
и герпесвирусными инфекциями» // Российский
иммунологический журнал, 2023. Т. 26, № 4. С. 647-656.
doi: 10.46235/1028-7221-13908-PEO

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

For citation:

M.G. Atazhakhova, I.V. Nesterova, G.A. Chudilova,
V.A. Matushkina, S.V. Kovaleva, V.N. Chapurina "Positive
effects of recombinant interferon $\alpha 2b$ on the phenotype of
 $CD16^+IFN\alpha/\beta R1^-CD119^+$, $CD16^+IFN\alpha/\beta R1^+CD119^-$
neutrophil granulocyte subset in patients with post-COVID
syndrome and herpesvirus infections", Russian Journal
of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskiy Zhurnal, 2023,
Vol. 26, no. 4, pp. 647-656.
doi: 10.46235/1028-7221-13908-PEO

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

DOI: 10.46235/1028-7221-13908-PEO

У пациентов ГИ1 с микст-ГВИ установлены более выраженные клинические проявления СХУ и КР, чем при моно-ГВИ. Выявлено повышение плотности экспрессии всех рецепторов на $CD16^+IFN\alpha/\beta R1^+CD119^-$ НГ и $CD16^+IFN\alpha/\beta R1^-CD119^+$ НГ, свидетельствующих об активности НГ с инициацией цитотоксичности или NETosis, снижение фагоцитарной функции и напряженность NADPH-оксидазной активности с истощением резервных возможностей НГ в ГИ1. Получены данные о позитивном влиянии рекIFN α 2b *in vitro* (ГИ1а): в субпопуляции $CD16^+IFN\alpha/\beta R1^+CD119^-$ – снижение плотности экспрессии CD16 рецептора и усиление экспрессии IFN $\alpha/\beta R1$ рецептора, в субпопуляции $CD16^+IFN\alpha/\beta R1^-CD119^+$ сохранение повышенной MFI CD16 и MFI CD119 рецепторов, восстановление дефектной фагоцитарной функции НГ и снижение чрезмерной активности NADPH-оксидаз.

Позитивные эффекты влияния рекIFN α 2b у пациентов с ПКС на дефектно функционирующие НГ, обосновывают возможность использования иммунотерапии лекарственным препаратом на основе рекIFN α 2b в комбинации с высокоактивными антиоксидантами в лечении различных проявлений ПКС, в том числе при СХУ, КР, ГВИ, что обеспечит адекватное функционирование противовирусных и регуляторных механизмов иммунной системы.

Ключевые слова: постковидный синдром, герпесвирусные инфекции, синдром хронической усталости, нейтрофильные гранулоциты, субпопуляции, рекомбинантный IFN α 2b

POSITIVE EFFECTS OF RECOMBINANT INTERFERON α 2b ON THE PHENOTYPE OF $CD16^+IFN\alpha/\beta R1^-CD119^+$, $CD16^+IFN\alpha/\beta R1^+CD119^-$ NEUTROPHIL GRANULOCYTE SUBSET IN PATIENTS WITH POST-COVID SYNDROME AND HERPESVIRUS INFECTIONS

Atazhakhova M.G.^a, Nesterova I.V.^{a, b}, Chudilova G.A.^a,
Matushkina V.A.^a, Kovaleva S.V.^a, Chapurina V.N.^a

^a Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation

^b P. Lumumba Peoples' Friendship University, Moscow, Russian Federation

Abstract. Post-COVID syndrome (PCS) is a multisystem inflammatory condition with manifestations of chronic fatigue syndrome (CFS) and cognitive disorders (CD), along with reactivation of chronic herpesvirus infections (HVI). The PCS manifestations require studying the molecular mechanisms associated with the production of IFN and receptor functions of neutrophil granulocytes (NG), which is relevant and promotes the search for immunotherapeutic strategies in patients with PCS. Our objective was to study the *in vitro* effects of recombinant interferon α 2b (recIFN α 2b) on the phenotype of $CD16^+IFN\alpha/\beta R1^-CD119^+$, $CD16^+IFN\alpha/\beta R1^+CD119^-$ subsets and functional activity of NG in patients with post-COVID syndrome and herpesvirus infections. Materials and methods: 45 patients (24-60 years old) with PCS and HVI (HSV 1, EBV, HHV6, CMV) comprised the study group 1 (SG1). A questionnaire was conducted to assess the severity of PCS symptoms using a point scale. We performed a study of the content and phenotype of NG subsets, i.e., the $CD16^+IFN\alpha/\beta R1^-CD119^+$, $CD16^+IFN\alpha/\beta R1^+CD119^-$, $CD16^+IFN\alpha/\beta R1^+CD119^+$ subpopulation, phagocytic and NADPH oxidase function of NG before and after *in vitro* incubation with recIFN α 2b (50 IU/ μ L, for 60 min, at 37 °C) in the study group 1a (SG1a). The comparison group (CG) of 30 volunteers examined during the pre-COVID period. Results: We revealed more pronounced clinical manifestations of CFS and CD in SG1 patients with mixed HVI, than in mono-HVI cases. Increased expression density of all receptors was registered on $CD16^+IFN\alpha/\beta R1^+CD119^-$ NG and $CD16^+IFN\alpha/\beta R1^-CD119^+$ NG, thus suggesting the NG activation with initiation of cytotoxicity or NETosis, a decrease in phagocytic function and intensity of NADPH oxidase activity with depletion of NG reserve capacity in SG1. We have obtained some data on the positive effect of recIFN α 2b *in vitro* (SG1a), e.g., decreased CD16 expression density and enhancement of

IFN α / β R1 receptor expression in the CD16⁺IFN α / β R1⁺CD119⁻ subset. In the CD16⁺IFN α / β R1⁻CD119⁺ subset, we have found persistence of increased MFI CD16 and MFI CD119 receptors, restoration of defective NG phagocytic function and reduced excessive activity of NADPH oxidases. Conclusion: The positive effects of the recIFN α 2b influence on deficient function of NG in PCS patients suggest an opportunity of using immunotherapy with a recIFN α 2b-based drug, combined with highly active antioxidants for treatment of various PCS manifestations including CFS, CD, HVI, thus, probably, ensuring adequate functioning of antiviral and regulatory mechanisms of the immune system.

Keywords: post-COVID syndrome, herpesvirus infections, chronic fatigue syndrome, neutrophil granulocytes, subsets, recombinant IFN α 2b

Введение

Постковидный синдром (ПКС) стал актуальной проблемой врачей различных специальностей вследствие широкой распространенности и разнообразия клинических проявлений.

ПКС клиническое состояние, с сохраняющимися симптомами, которые способны со временем меняться, исчезать, вновь возникать, и отражают дисфункцию многих систем и органов организма [5].

Выделяют несколько механизмов, оказывающих влияние на развитие ПКС: иммунная дисрегуляция, аутоиммунные процессы, синдром системного воспалительного ответа, повреждение сосудов микроциркуляторного русла, вегетативная, нервная, эндокринная и метаболическая дисфункции, прямое цитотоксическое действие вируса на клетки, и длительная вирусная персистенция [9]. Кроме этого, большинство пациентов с ПКС могут подвергаться повышенному риску коинфекций, вызванных вирусными, бактериальными, грибковыми или другими патогенами [10].

Основные клинические проявления ПКС включают множество состояний и симптомов, при этом процесс носит длительный, волнообразный, часто рецидивирующий характер, что существенно снижает физическую активность и качество жизни пациентов. Развитие синдрома хронической усталости (СХУ) и стойкое ощущение когнитивных расстройств (КР), являются наиболее частыми жалобами пациентов с ПКС и характеризуется астенией различной степени тяжести. Проявления СХУ характеризуются стойким ощущением усталости, снижением работоспособности и толерантности к физическим нагрузкам. КР проявляются снижением процессов запоминания, усвоением новой информации, отмечаются трудности с концентрацией внимания, снижение умственной работоспособности, забывчивость, ощущение «тумана в голове», мигрирующие боли в суставах и мышцах [1]. Эти перечисленные осложнения встречаются у

30-50% реконвалесцентов, чаще у женщин, чем у мужчин, а их выраженность и стойкость более высока у больных с полиорганными и коморбидными формами патологии, находившихся на лечении в палатах интенсивной терапии и реанимационных отделениях [13].

Многочисленные исследования, связанные с индуцированной SARS-CoV-2 реактивацией герпесвирусных инфекций (ГВИ) показали, что острое течение COVID-19 сопровождается дефицитом выработки IFN, при этом происходит активация персистирующих ГВИ – вируса Эпштейна–Барр (ВЭБ), цитомегаловируса (ЦМВ), вируса герпеса человека 6-го типа (ВГЧ6) [12]. В первом систематическом обзоре с метаанализом 85 исследований из 18 стран мира приведены обобщенные результаты об активации ГВИ у пациентов с острой и перенесенной инфекцией COVID-19 [6]. Показано, что пациенты с ПКС имели реактивацию вируса Эпштейна–Барр (ВЭБ) – 42,6%, вируса герпеса человека 6-го типа (ВГЧ6) у 25% и ВЭБ/ВГЧ6 у 32,4% [7, 14].

Нарушения в работе иммунной системы (ИС) в противовирусной защите при ПКС могут сопровождаться истощением и функциональной неполноценностью клеток врожденного и адаптивного иммунитета с последующим прогрессированием нарушений молекулярных механизмов, связанных с продукцией интерферона (IFN) возникших при остром COVID-19 [5]. В частности, было показано, что при COVID-19 наблюдается блокада продукции IFN α и IFN γ , повышение уровней цитокинов ассоциированных с активацией НГ, изменение содержания и фенотипа субпопуляций НГ, изменение их функций [2]. Также продемонстрированы эффекты позитивного влияния рекомбинантного IFN α 2b (рекIFN α 2b) *in vitro* на количественные и фенотипические характеристики субпопуляций НГ [3]. Кроме того установлены различные дисрегуляторные нарушения в системе противовирусной иммунной защиты и системе IFN у пациентов с атипичными хроническими активными ГВИ, которые формируют состояние иммунокомпрометированности

у пациентов с ПКС, имеют как локальные, так и системные проявления и является одним из основных признаков постковидного периода [4].

НГ являясь эффекторными и регуляторными клетками ИС экспрессируют поверхностные мембранные рецепторы к $IFN\alpha$ и $IFN\gamma$, формируя субпопуляции с определенным фенотипом. Связываясь с этими рецепторами, $IFN\alpha$ и $IFN\gamma$ способны проявлять свои регуляторные действия и модулировать функциональную активность НГ [11]. Таким образом, изучение молекулярных механизмов нарушений не только в остром периоде COVID-19, но и в постковидном периоде, особенно у пациентов с проявлениями ПКС, связанных с продукцией IFN , рецепторной функцией НГ – $IFN\alpha/\beta R$, $CD119$ ($IFN\gamma$) на мембране НГ периферической крови (ПК), является актуальным и представляет несомненный интерес, что может помочь в поиске терапевтических стратегий, с целью восстановления и усиления врожденного иммунного ответа против перенесенного SARS-CoV-2.

Цель – изучить эффекты влияния рекомбинантного $IFN\alpha 2b$ *in vitro* на фенотип субпопуляций $CD16^+IFN\alpha/\beta R1^+CD119^+$, $CD16^+IFN\alpha/\beta R1^+CD119^-$ и функциональную активность НГ у пациентов с постковидным синдромом и герпесвирусными инфекциями

Материалы и методы

Проведено исследование 45 пациентов (24 женщины, 21 мужчина), 24-60 лет, находившихся на диспансерном наблюдении с различными симптомами и проявлениями ПКС спустя 12 и более недель после перенесенной инфекции SARS-CoV-2, группа исследования 1 (ГИ1).

Пациенты прошли анкетирование по разработанной нами ранее шкале для оценки тяжести симптомов ПКС в баллах от 0 до 5 [4].

Кроме традиционных методов, включавших сбор анамнеза, методы физикального обследования, общий и биохимический анализы крови, использовали метод ПЦР в реальном времени для детекции ГВИ (ВПГ1, ВЭБ, ВГЧ6, ЦМВ) в соскобе с миндалин и задней стенки глотки, что имело значение для выявления реактивации хронических ГВИ.

Проведено исследование содержания НГ субпопуляций $CD16^+IFN\alpha/\beta R1^+CD119^+$, $CD16^+IFN\alpha/\beta R1^+CD119^-$, $CD16^+IFN\alpha/\beta R1^+CD119^+$, и их фенотипа по плотности экспрессии мембранных рецепторов – MFI (FC 500, Beckman Coulter, США), конъюгаты МКАТ: $IFN\alpha\beta R1$ -FITC, $CD119$ -PE, $CD16$ -ECD (Beckman Coulter Inter-

national S.A., Франция), до инкубации (ГИ1) и после инкубации с рек $IFN\alpha 2b$ (50 МЕ/мкл) в течение 60 мин при температуре 37 °C *in vitro* – группа исследования 1a (ГИ1a).

В ГИ1 и ГИ1a оценивали фагоцитарную функцию НГ: по доли активно-фагоцитирующих НГ (%ФАН); объему захваченного бактериального материала (*S. aureus*, штамм 209) по показателям: фагоцитарное число (ФЧ), фагоцитарный индекс (ФИ) и завершения фагоцитарного акта по проценту переваривания (%П), индексу переваривания (ИП). Параллельно производился подсчет на 100 НГ доли клеток в апоптозе и клеток образующих нейтрофильные экстрацеллюлярные сети (NET). Активность NADPH-оксидазы НГ определяли в NBT-спонтанном тесте (NBTсп.) и в NBT-стимулированном *in vitro* *S. aureus* тесте (NBTст.) по показателям: средний цитохимический индекс (СЦИсп, СЦИст), процент формазан-позитивных клеток (%ФПКсп, %ФПКст) и коэффициент мобилизации (КМ) – %ФПКст/%ФПКсп. Группа сравнения (ГС) сформирована из 30 добровольцев сопоставимых по полу и возрасту, обследованных в доковидный период.

Исследование проведено согласно требованиям Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации 2013 г. У всех пациентов было получено письменное информированное согласие на участие в исследовании и на обработку персональных данных.

Для статистической обработки полученных данных использованы компьютерные программы Microsoft Excel. Результаты представляли в виде медианы (Me) и верхнего и нижнего квартилей ($Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$), применяли критерии Манна–Уитни и Вилкоксона. Достоверность различия определяли при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

В ходе анкетирования у 100% исследуемых пациентов ГИ1 с ПКС установлены клинические проявления СХУ и КР различной степени выраженности. Согласно разработанной нами 5-балльной шкале (0 баллов – отсутствие симптомов; 1 балл – минимальные симптомы; 2 балла – средняя выраженность симптомов; 3 балла – тяжелая степень; 4 балла – очень тяжелая степень; 5 баллов – крайне тяжелая степень), общее количество баллов в ГИ1 составило – 17,0 (15,25–19,75), что в 17 раз больше чем в ГС-1,0 балл (0,5–2,0) ($p < 0,05$) (табл. 1).

Наиболее беспокоящими жалобами пациентов ГИ1 являлись: снижение работоспособности,

повышенная утомляемость, снижение толерантности к физическим нагрузкам, стойкое ощущение хронической усталости. Также все пациенты предъявляли жалобы разной степени выраженности на нарушение когнитивных функций в виде снижения процессов запоминания, трудности с концентрацией внимания, ощущение «тумана в голове», артралгии, миалгии. Клинические признаки ГВИ у пациентов ГИ1 были выявлены с их последующей детекцией. Согласно полученным данным, выявлено, что в ГИ1 частота встречаемости моно и микст-ГВИ была следующей: у 57,8% пациентов отмечались клинические проявления ВПГ1-инфекции, орофациальной локализации; из них у 37,2% детектировалась моно-

ГВИ-ВПГ1-инфекция; у 62,8% детектировалась микст-ГВИ: ВПГ1-инфекция и ВЭБ-инфекция (36,8%); ВПГ1-инфекция и ВЧГ6-инфекция (21%); ВПГ1-инфекция, ВЭБ-инфекция и ВЧГ6-инфекция (5%). Стоит отметить, что наиболее выраженные клинические проявления ПКС в ГИ1 с лидирующими симптомами СХУ и КР отмечались среди пациентов, страдающих микст-ГВИ, а выраженность симптомов составляла 19 (17-21) баллов, тогда как при моно-ГВИ – 15 (14-16) баллов.

При исследовании НГ ПК ГС выявлены 3 субпопуляции НГ: CD16⁺IFN α / β RI⁻CD119⁺, CD16⁺IFN α / β RI⁺CD119⁻, CD16⁺IFN α / β RI⁺CD119⁺. Доля субпопуляции НГ CD16⁺IFN α / β RI⁻CD119⁺

ТАБЛИЦА 1. ВЫРАЖЕННОСТЬ КЛИНИЧЕСКИХ ПРОЯВЛЕНИЙ ПОСТКОВИДНОГО СИНДРОМА У ПАЦИЕНТОВ, ПЕРЕНЕСШИХ COVID-19 (В БАЛЛАХ), Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 1. SEVERITY OF CLINICAL MANIFESTATIONS OF POST-COVID SYNDROME IN PATIENTS WHO UNDERWENT COVID-19 (IN POINTS), Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

Симптомы Symptoms	Группа сравнения (ГС) Comparison group n = 30	Пост-COVID-19 (ГИ1) Post-COVID-19 Study group 1 n = 45
Синдром хронической усталости, непереносимость физической нагрузки, снижение работоспособности, повышенная утомляемость Chronic fatigue syndrome, exercise intolerance, decreased performance, increased fatigue	0,5 (0,1-1,0)	3,0 (2,0-3,0)*
Снижение процессов запоминания, трудности с концентрацией внимания, ощущение тумана в голове Reduced memorization processes, difficulty concentrating, "brain fog"	0,0 (0,0-0,0)	3,0 (2,0-3,0)*
Головная боль, головокружение, мигрень Headache, dizziness, migraine	0,5 (0,1-1,0)	2,0 (2,0-3,0)*
Артралгии, миалгии Arthralgia, myalgia	0,0 (0,0-0,0)	2,0 (1,0-3,0)*
Панические атаки, расстройства настроения, эмоциональная лабильность, психогенная депрессия Panic attacks, mood disorders, emotional lability, psychogenic depression	0,0 (0,0-0,0)	2,0 (2,0-2,0)*
Нарушения засыпания и сна Falling asleep and sleep disorders	0,0 (0,0-0,0)	2,0 (2,0-2,0)*
Повышенная потливость, субфебрилитет Excessive sweating, subfebrility	0,0 (0,0-0,0)	1,0 (1,0-2,0)*
Кашель и одышка Cough and shortness of breath	0,0 (0,0-0,0)	1,0 (0,0-1,0)
Клинические проявления герпесвирусных инфекций Clinical manifestations of herpesvirus infections	0,0 (0,0-0,0)	1,0 (0,0-2,0)*
Общее количество баллов Total number of points	1,0 (0,5-2, 0)	17,0 (15,25-19,75)*

Примечание. * – значимость отличий от показателей группы сравнения; p < 0,05.

Note. *, the significance of differences from the indicators of the comparison group; p < 0.05.

составляют 93,7 (89,8-96,5) % с плотностью экспрессии по MFI CD16 – 39,8 (20,4-51,3) и CD119⁺(IFN γ) – 2,8 (2,5-3,1). Субпопуляция CD16⁺IFN α / β R1⁺CD119⁻, не экспрессирующая рецептор к IFN γ , была представлена 1,4 (0,5-2,4) % НГ с плотностью экспрессии по MFI IFN α / β R1 – 3,4 (2,6-4,1) и MFI CD16 – 39,9 (22,9-54,5). Также определялась малочисленная субпопуляция одновременно экспрессирующая IFN α / β и IFN γ рецепторы НГ CD16⁺IFN α / β R1⁺CD119⁺ составляющая 0,9 (0,4-1,8) % НГ, но при этом имеющая

более высокие значения плотности экспрессии IFN α / β R1 (p > 0,05) и CD119 молекул (p > 0,05).

Отличительной особенностью ГИ1 явилось отсутствие в 93% случаев (42 пациента) субпопуляции CD16⁺IFN α / β R1⁺CD119⁺, при этом только у 3 пациентов – в 7% случаев, с микст-ГВИ (ВПГ1-инфекция, ВЭБ-инфекция и ВЧГ6-инфекция) регистрировались 0,3 (0,3-0,7) % НГ субпопуляции CD16⁺IFN α / β R1⁺CD119⁺ с повышенными в 1,8 раза MFI IFN α / β R1-10,3 (9,82-10,5), в 6 раз CD119 – 18,4 (10,4-34,8) и в

ТАБЛИЦА 2. ЭФФЕКТЫ ВЛИЯНИЯ РЕКОМБИНАНТНОГО IFN α 2b НА ФЕНОТИП СУБПОПУЛЯЦИЙ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ, ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ РЕЦЕПТОРЫ К IFN I И II ТИПОВ И АКТИВАЦИОННЫЙ МАРКЕРНЫЙ РЕЦЕПТОР CD16, У ПАЦИЕНТОВ С ПОСТКОВИДНЫМ СИНДРОМОМ, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 2. EFFECTS OF RECOMBINANT IFN α 2b ON THE PHENOTYPE OF NEUTROPHIL GRANULOCYTE SUBPOPULATIONS EXPRESSING TYPE I AND II IFN RECEPTORS AND CD16 ACTIVATION MARKER RECEPTOR IN PATIENTS WITH POST-COVID SYNDROME, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

Показатели Parameters	Группа сравнения (ГС) Comparison group n = 30	Пост-COVID-19 до инкубации (ГИ1) Post-COVID-19 Study group 1 n = 45	Пост-COVID-19 после инкубации + рекIFN α 2b (ГИ1a) Post-COVID-19 + recombinant IFN α 2b Study group 1a n = 45
CD16⁺IFNα/βR1⁺CD119⁺НГ CD16 ⁺ IFN α / β R1 ⁺ CD119 ⁺ NG			
НГ, % NG, %	93,7 (89,8-96,5)	94,4 (92,6-96,1)	94,0 (92,4-95,0)
MFI CD16	39,8 (20,4-51,3)	103,5* (83,9-121,0)	110,0* (95,7-127,0)
MFI CD119	2,8 (2,5-3,1)	5,7* (5,4-6,8)*	5,0* (3,7-6,3)
CD16⁺IFNα/βR1⁺CD119⁻НГ CD16 ⁺ IFN α / β R1 ⁺ CD119 ⁻ NG			
НГ, % NG, %	1,4 (0,5-2,4)	0,5 (0,4-2,0)	1,6 (0,5-1,9)
MFI CD16	39,9 (22,9-54,5)	67,7* (58,5-100,3)*	50,0 (40,1-62,3)
MFI IFN α / β	3,4 (2,6-4,1)	15,3* (6,8-22,2)*	19,2* (13,9-26,1)
CD16⁺IFNα/βR1⁺CD119⁻НГ CD16 ⁺ IFN α / β R1 ⁺ CD119 ⁻ NG			
НГ, % NG, %	0,9 (0,4-1,8)	0	0
MFI CD16	39,1 (26,6-50,3)	0	0
MFI IFN α / β	5,7 (4,6-6,5)	0	0
MFI CD119	3,2 (2,9-5,8)	0	0

Примечание. * – значимость отличий от показателей группы сравнения; p < 0,05.

Note. *, the significance of differences from the indicators of the comparison group; p < 0.05.

1,4 раза CD16- 54,7 (38,4-91,8) по отношению к значениям ГС ($p_{1-3} < 0,05$). Содержание НГ субпопуляции CD16⁺IFN α / β R1⁻CD119⁺НГ в ГИ1 не отличалось от ГС ($p > 0,05$), но при этом отмечалось увеличение плотности экспрессии рецепторов по MFI в 2,6 раза CD16 ($p < 0,05$) и в 1,9 раза CD119 ($p < 0,05$). Также наблюдалась тенденция к снижению в 2,8 раза содержания субпопуляции CD16⁺IFN α / β R1⁺CD119-НГ ($p > 0,05$). Для этой субпопуляции были характерны повышенные уровни экспрессии в 4,5 раза рецептора

IFN α / β R1 ($p < 0,05$) и в 1,7 раза CD16 ($p < 0,05$) по отношению к показателям ГС (табл. 2).

Инкубация НГ-пациентов с ПКС (ГИ1а) с рекIFN α 2b *in vitro* не влияла на количество НГ субпопуляций CD16⁺IFN α / β R1⁻CD119⁺ и CD16⁺IFN α / β R1⁺CD119⁺ как по сравнению с показателями ГС ($p_{1,2} > 0,05$), так и по отношению к значениям до инкубации ГИ ($p_{1,2} > 0,05$). В то же время на НГ субпопуляции CD16⁺IFN α / β R1⁻CD119⁺ наблюдались незначительные тенденции увеличения плотности экспрессии по MFI CD16

ТАБЛИЦА 3. ЭФФЕКТЫ ВЛИЯНИЯ РЕКОМБИНАНТНОГО IFN α 2b НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ ПАЦИЕНТОВ С ПОСТКОВИДНЫМ СИНДРОМОМ В СИСТЕМЕ *IN VITRO*, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 3. EFFECTS OF RECOMBINANT IFN α 2b ON THE FUNCTIONAL ACTIVITY OF NEUTROPHIL GRANULOCYTES OF PATIENTS WITH POST-COVID SYNDROME IN THE *IN VITRO* SYSTEM, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

Показатели Parameters	Группа сравнения (ГС) Comparison group n = 30	Пост-COVID-19 до инкубации (ГИ1) Post-COVID-19 Study group 1 n = 45	Пост-COVID-19 после инкубации + рекIFN α 2b (ГИ1а) Post-COVID-19 + recombinant IFN α 2b Study group 1a n = 45
%ФАН %PhAN	65,8 (60,9-79,6)	49,0 (48,0-52,0)*	62,0 (57,5-67,0)^
ФЧ PhN	3,4 (2,1-4,2)	3,30 (3,1-3,4)	2,5 (2,3-2,6)^
ФИ PhI	1,8 (1,6-2,0)	1,6 (1,5-1,8)	1,63 (1,56-1,70)
%П %D	58,9 (51,3-78,3)	40,9 (40,5-41,7)*	47,2 (42,9-51,5)^
ИП ID	1,90 (1,10-2,40)	0,65 (0,61-0,72)*	1,0 (0,74-1,50)^
СЦИ сп. MCIsP	0,09 (0,06-0,10)	0,46 (0,41-0,49)	0,2 (0,18-0,21)^
СЦИ ст. MCPst	0,20 (0,08-0,30)	0,36 (0,33-0,39)	0,34 (0,32-0,37)
%ФПК сп. %FPCsp	2,4 (2,3-3,5)	8,0 (6,8-9,0)*	6,0 (6,0-6,5)*
%ФПК ст %FPCst	5,5 (2,8-6,3)	6,0 (5,8-7,0)	8,0 (8,0-9,0)* ^
КМ MC	1,8 (1,60-2,20)	0,86 (0,75-1,26)*	1,78 (1,58-1,92)^
NET	1,0 (0,0-1,0)	2,0 (1,75-2,50)*	1,0 (1,0-2,0)
Клетки в апоптозе Cells in apoptosis	1,0 (0,0-1,0)	2,0 (1,0-3,0)	2,0 (1,0-2,0)

Примечание. * – значимость отличий от показателей группы сравнения; $p < 0,05$. ^ – значимость отличий показателей ГИ1 до инкубации и ГИ1а после инкубации с рекIFN α 2b; $p < 0,05$.

Note. *, the significance of differences from the indicators of the comparison group; $p < 0.05$. ^, the significance of the differences in the indicators of Group 1 before incubation and Group 1a after incubation with рекIFN α 2b; $p < 0.05$.

до 110,0 (95,7-127,0) против 103,5 (83,9-121,0) в ГИ1 ($p > 0,05$) и снижения плотности экспрессии по MFI CD119 до 5,0 (3,7-6,3) против 5,7 (5,4-6,8) в ГИ1 ($p > 0,05$). При этом регистрируемые показатели MFI CD16 и MFI CD119 оставались повышенными по отношению к уровню экспрессии молекул на НГ данной субпопуляции в ГС ($p_{1,2} < 0,05$) (табл. 1).

Эффекты влияния рекIFN α 2b на фенотип субпопуляций CD16⁺IFN α / β R1⁺CD119⁻НГ заключались в снижении в 1,4 раза MFI CD16 по отношению к показателям ГИ1 ($p < 0,05$) до уровня, определяемого в ГС ($p > 0,05$), при этом плотность экспрессии IFN α / β R1 увеличилась в 1,3 раза от значений, регистрируемых в ГИ1 пациентов с ПКС, оставаясь в 5,6 раза выше значений в ГС ($p > 0,05$) (табл. 2).

Анализ функционального потенциала НГ при ПКС выявил значительное снижение в 1,3 раза доли активно фагоцитирующих НГ (%ФАН) ($p < 0,05$), %П в 1,4 раза и 2,9 раза ИП ($p_{1,2} < 0,05$) по отношению к показателям ГС, на фоне увеличения содержания НГ образующих NETs и клеток в апоптозе. При этом в этой группе пациентов отмечалось: в спонтанном NBT-тесте напряженность NADPH-оксидаз по показателям СЦИсп – 0,46 (0,41-0,49) и %ФПКсп – 8,0 (6,8-9,0) % по отношению к ГС ($p_{1,2} < 0,05$). В стимулированном NBT-тесте при дополнительной нагрузке *S. aureus* повышение показателей СЦИст – 0,36 (0,33-0,39) и %ФПК 6,0 (5,8-7,0), что демонстрирует истощение оксидантного микробицидного потенциала, КМ-0,86 (0,75-1,26) ($p_{1,2} < 0,05$) (табл. 3).

После инкубации НГ пациентов с ПКС в системе *in vitro* с рекIFN α 2b отмечалось увеличение доли ФАН ($p < 0,05$) и восстановление процессов киллинга и переваривания (%П, ИП) до уровня показателей ГС ($p_{1,2} > 0,05$), снижение спонтанной и усиление стимулированной активности NADPH-оксидаз, как по показателям %ФПК, так и по СЦИ с сохранением резервного микробицидного потенциала, КМ – 1,78 (1,58-1,92). РекIFN α 2b в системе *in vitro* не влиял на процессы образования NETs и апоптоз (табл. 3).

Таким образом, у пациентов с ПКС на фоне моно- и микст-ГВИ выявлена трансформация фенотипа субпопуляций НГ CD16⁺IFN α / β R1⁺CD119⁻НГ и CD16⁺IFN α / β R1⁺CD119⁺НГ, несущих рецепторы к IFN α и IFN γ и активационный рецептор CD16, отвечающий, за цитотоксичность НГ по отношению к инфицированным вирусом клеткам. Выявлено значимое повышение плотности экспрессии всех

изучаемых рецепторов свидетельствующее об активации НГ с предположительной инициацией антителозависимой клеточной цитотоксической реакции или NETosis. При этом установлено снижение функциональной активности НГ проявляющееся в снижении процессов захвата и переваривания бактериальных антигенов и напряженности NADPH-оксидазной активности с истощением резервных возможностей НГ. Ранее нами были получены данные об аналогичных вариантах трансформации фенотипа субпопуляций НГ CD16⁺IFN α / β R1⁺CD119⁺, CD16⁺IFN α / β R1⁺CD119⁻, CD16⁺IFN α / β R1⁺CD119⁺ на фоне неадекватно низкого уровня IFN I и II типов у пациентов в острый период COVID-19 [3].

Учитывая, что IFN I и II типов усиливают NETosis [11], возможно предположить, что значительное повышение экспрессии рецепторов, отмечаемое в ГИ1, может усугубить нейтрофильную инфильтрацию и нетоз, а также связанные с этими процессами проявления ПКС, показано, что рекIFN α 2b в системе *in vitro* не влиял на процессы образования NETs и апоптоз.

Получены позитивные эффекты влияния рекIFN α 2b *in vitro* на фенотип субпопуляций и функции НГ. РекIFN α 2b *in vitro* не влиял на количество и соотношение 2 субпопуляций CD16⁺IFN α / β R1⁺CD119⁺, CD16⁺IFN α / β R1⁺CD119⁻. При этом на НГ субпопуляции CD16⁺IFN α / β R1⁺CD119⁺ сохранялись повышенные показатели MFI CD16 и MFI CD119 по отношению к уровню в ГС; на НГ субпопуляции CD16⁺IFN α / β R1⁺CD119⁻ отмечено снижение MFI CD16 до уровня ГС, и усилении экспрессии IFN α / β R1 по сравнению с показателями пациентов с ПКС и ГС. Такая модуляция фенотипа возможно необходима для восприятия цитокиновых сигналов и осуществления адекватного противовирусного ответа на ГВИ. На фоне воздействия *in vitro* с рекIFN α 2b отмечалось: увеличение доли ФАН и восстановление процессов киллинга и переваривания (%П, ИП) до уровня показателей ГС, снижение спонтанной и усиление стимулированной активности NADPH-оксидаз, как по показателям %ФПК, так и по СЦИ с сохранением резервного микробицидного потенциала.

Заключение

Анализ полученных результатов позволяет предположить, что у пациентов с ПКС сохраняется дефицит IFN, что способствует активации ГВИ. Полученные в настоящем исследовании позитивные эффекты влияния

рекIFN α 2b в системе *in vitro* на дефектно функционирующие НГ в виде изменения фенотипа субпопуляций НГ: CD16⁺IFN α / β R1-CD119⁺, CD16⁺IFN α / β R1⁺CD119⁻, восстановления баланса восприятия IFN, восстановления эффекторных функций НГ с уменьшением их агрессивного действия, спровоцированного перенесенным COVID-19 и реактивацией ГВИ, у пациентов с

ПКС, дополняют известные сведения об иммунопатогенезе ПКС и молекулярные механизмы позитивного влияния интерферонотерапии, и обосновывают целесообразность использования лекарственного препарата на основе рекIFN α 2b в комбинации с высокоактивными антиоксидантами у пациентов с проявлениями ПКС и ГВИ [4].

Список литературы / References

1. Ковальчук В.В., Дроздова М.С., Чепель Ю.А., Нестерин К.В. Постковидный синдром. Мифы и реалии // Эффективная фармакотерапия, 2022. Т. 18, № 23. С. 20-26. [Kovalchuk V.V., Drozdova M.S., Chepel Yu.A., Nesterin K.V. Postcovid syndrome. Myths and realities. *Effektivnaya farmakoterapiya = Effective Pharmacotherapy*, 2022, Vol. 18, no. 23, pp. 20-26. (In Russ.)]
2. Нестерова И.В., Городин В.Н., Матушкина В.А., Чудилова Г.А., Чапурина В.Н., Халтурина Е.О., Тетерин Ю.В., Ломтатидзе Л.В., Пирогова А.И. Неоднозначная роль нейтрофильных гранулоцитов в иммунопатогенезе COVID-19: взаимосвязь с дисбалансом провоспалительных нейтрофил-ассоциированных цитокинов и дефицитом интерферона- α // Инфекционные болезни, 2022. Т. 20, № 4. С. 12-24. [Nesterova I.V., Gorodin V.N., Matushkina V.A., Chudilova G.A., Chapurina V.N., Khalturina E.O., Teterin Yu.V., Lomtadidze L.V., Pirogova A.I. The ambiguous role of neutrophil granulocytes in the immunopathogenesis of COVID-19: the relationship with the imbalance of pro-inflammatory neutrophil-associated cytokines and interferon- α deficiency. *Infektsionnye bolezni = Infectious Diseases*, 2022, Vol. 20, no. 4, pp. 12-24. (In Russ.)]
3. Нестерова И.В., Городин В.Н., Чудилова Г.А., Чапурина В.Н., Матушкина В.А., Габдрахманова Р.Ю., Ломтатидзе Л.В., Ковалева С.В., Малиновская В.В., Семененко Т.А. Эффекты влияния рекомбинантного интерферона α -2b на фенотип субпопуляций нейтрофильных гранулоцитов пациентов с COVID-19 // Инфекционные болезни, 2022. Т. 20, № 1. С. 43-51. [Nesterova I.V., Gorodin V.N., Chudilova G.A., Chapurina V.N., Matushkina V.A., Gabdrakhmanova R.Yu., Lomtadidze L.V., Kovaleva S.V., Malinovskaya V.V., Semenenko T.A. Effects of recombinant interferon α -2b on the phenotype of neutrophil granulocyte subpopulations of patients with COVID-19. *Infektsionnye bolezni = Infectious Diseases*, 2022, Vol. 20, no. 1, pp. 43-51. (In Russ.)]
4. Нестерова И.В., Халтурина Е.О., Малиновская В.В. Клинико-иммунологическая эффективность интеграционной программы реабилитации иммунной системы у пациентов с атипичной хронической активной герпесвирусной коинфекцией до и во время COVID-19, а также в постковидном периоде // Эффективная фармакотерапия, 2022. Т. 18, № 37. С. 30-41. [Nesterova I.V., Khalturina E.O., Malinovskaya V.V. Clinical and immunological effectiveness of the integration program for the rehabilitation of the immune system in patients with atypical chronic active herpesvirus coinfection before and during COVID-19, as well as in the postcovid period. *Effektivnaya farmakoterapiya = Effective Pharmacotherapy*, 2022, Vol. 18, no. 37, pp. 30-41. (In Russ.)]
5. Хасанова Д.Р., Житкова Ю.В., Васкаева Г.Р. Постковидный синдром: обзор знаний о патогенезе, нейропсихиатрических проявлениях и перспективах лечения // Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика, 2021. Т. 13, № 3. С. 93-98. [Khasanova D.R., Zhitkova Yu.In, Maskaeva G.R. Postcovid syndrome: a review of knowledge about pathogenesis, neuropsychiatric manifestations and treatment prospects. *Nevrologiya, neyropsikhiatriya, psikhosomatika = Neurology, Neuropsychiatry, Psychosomatics*, 2021, Vol. 13, no. 3, pp. 93-98. (In Russ.)]
6. Banko A., Miljanovic D., Cirkovic A. Systematic review with meta-analysis of active herpesvirus infections in patients with COVID-19: Old players on the new field. *Int. J. Infect. Dis.*, 2023, Vol. 130, pp. 108-125.
7. Chen J., Song J., Dai L., Post S.R., Qin Z. SARS-CoV-2 infection and lytic reactivation of herpesviruses: a potential threat in the postpandemic era? *J. Med. Virol.*, 2022, Vol. 94, pp. 5103-5111.
8. Chua R.L., Lukassen S., Trump S., Hennig B.P., Wendisch D., Pott F., Debnath O., Thürmann L., Kurth F., Völke M. T., Kazmierski J., Timmermann B., Twardziok S., Schneider S., Machleidt F., Müller-Redetzky H., Maier M., Krannich A., Schmidt S., Balzer F., Liebig J., Loske J., Suttorp N., Eils J., Ishaque N., Liebert U. G., von Kalle C., Hocke A., Witzernath M., Goffinet C., Drosten C., Laudi S., Lehmann I., Conrad C., Sander L.-E., Eils R. COVID-19 severity correlates with airway epithelium-immune cell interactions identified by single-cell analysis. *Nat. Biotechnol.*, 2020, Vol. 38, pp. 970-979.
9. Inoue S., Hatakeyama J., Kondo Y., Hifumi T., Sakuramoto H., Kawasaki T., Taito S., Nakamura K., Unoki T., Kawai Y., Kenmotsu Y., Saito M., Yamakawa K., Nishida O. Post-intensive care syndrome: its pathophysiology, prevention, and future directions. *Acute Med. Surg.*, 2019, Vol. 6, no. 3, pp. 233-246.
10. Lescure F.X., Bouadma L., Nguyen D., Parisey M., Wicky P.H., Behillil S., Gaymard A., Bouscambert-Duchamp M., Donati F., Le H.Q., Enouf V., Houhou-F.N., Valette M., Mailles A., Lucet J.-C., Mentre F., Duval X.,

Descamps D., Malvy D., Timsit J.-F., Lina B., van-der-Werf S., Yazdanpanah Y. Clinical and virological data of the first cases of COVID-19 in Europe: A case series. *Lancet Infect. Dis.*, 2020, Vol. 20, no. 6, pp. 697-706.

11. Reusch N., de Domenico E., Bonaguro L., Schulte-Schrepping J., Baßler K., Schultze J.L., Aschenbrenner A.C. Neutrophils in COVID-19. *Front. Immunol.*, 2021, Vol. 12, 652470. doi: 10.3389/fimmu.2021.652470.

12. Simonnet A., Engelmann I., Moreau A.S., Garciaa B., Sixa S., Kalioubie A.E., Robriquet L., Hober D., Jourdain M. High incidence of Epstein-Barr virus, cytomegalovirus, and human-herpes virus-6 reactivations in critically ill patients with COVID-19. *Infect. Dis.*, 2021, Vol. 51, no. 3, pp. 296-299.

13. Yang J., Zheng Y., Gou X., Pu K., Chen Z., Guo Q., Ji R., Wang H., Wang Y., Zhou Y. Prevalence of comorbidities and its effects in patients infected with SARS-CoV-2: a systematic review and meta-analysis. *Int. J. Infect. Dis.*, 2020, Vol. 94, pp. 91-95.

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.

Авторы:

Атажыхова М.Г. — аспирант кафедры клинической иммунологии, аллергологии и лабораторной диагностики ФПК и ППС ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Краснодар, Россия

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

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

Матушкина В.А. — ассистент кафедры инфекционных болезней и эпидемиологии ФПК и ППС ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Краснодар, Россия

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

Чапурина В.Н. — ассистент кафедры клинической иммунологии, аллергологии и лабораторной диагностики ФПК и ППС ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Краснодар, Россия

Authors:

Atazhakhova M.G., Postgraduate Student, Department of Clinical Immunology, Allergology and Laboratory Diagnostics, Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation

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

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

Matushkina V.A., Assistant Professor, Department of Infectious Diseases and Epidemiology, Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation

Kovaleva S.V., PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Department of Clinical Immunology, Allergology and Laboratory Diagnostics, Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation

Chapurina V.N., Assistant Professor, Department of Clinical Immunology, Allergology and Laboratory Diagnostics, Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation

СЕКРЕТОРНЫЙ IgA У ПАЦИЕНТОВ С COVID-19 ПРИ РАЗЛИЧНЫХ СПОСОБАХ ПРИМЕНЕНИЯ ПОЛИКОМПОНЕНТНОЙ ВАКЦИНЫ «ИММУНОВАК-ВП-4»

Костинов М.П.^{1,2}, Абрамова Н.Д.¹, Осипцов В.Н.³, Татевосов В.Р.³,
Гайнитдинова В.В.², Крюкова Н.О.⁴, Баранова И.А.⁴, Хромова Е.А.¹,
Коровкина Е.С.¹, Чучалин А.Г.⁴, Свитич О.А.¹, Машилов К.В.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» (Сеченовский университет), Москва, Россия

³ ФГКУЗ «Главный военный клинический госпиталь войск национальной гвардии Российской Федерации», г. Балашиха, Московская обл., Россия

⁴ ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Резюме. Иммуитет слизистых оболочек выполняет важнейшую функцию в профилактике респираторных инфекций, к котором относится и возбудитель COVID-19. Поиск подходов к активации синтеза постинфекционных антител посредством коррекции факторов врожденного и адаптивного иммунитета на уровне слизистых оболочек респираторного тракта у пациентов с инфекцией, вызванной новым коронавирусом, может оказаться актуальным в лечении пациентов с COVID-19.

Цель исследования – изучение концентрации sIgA в верхних отделах респираторного тракта у пациентов с подтвержденным диагнозом «коронавирусная инфекция, вызванная вирусом COVID-19» и анализ влияния иммуностимулирующего препарата бактериального происхождения на секрецию sIgA.

Пациенты были распределены на две группы: 1-я группа (n = 45) получала базисную терапию; 2-я группа пациентов (n = 33) дополнительно к базисной терапии получала бактериальную вакцину «Иммуновак-ВП-4» по комбинированной схеме.

Забор биоматериала: соскоб эпителиальных клеток со слизистой оболочки носовой полости, фарингеальный соскоб и секрет слюнных желез на 1-й, 14-й и 30-й дни исследования. Уровни sIgA во всех биологических жидкостях были исследованы с помощью метода твердофазного иммуноферментного анализа (АО «Вектор-Бест», Россия).

Адрес для переписки:

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

Address for correspondence:

Elena S. Korovkina
I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera
5a Malyy Kasenny Lane
Moscow
105064 Russian Federation
Phone/fax: +7 (495) 917-49-00.
E-mail: eskorovkina@yandex.ru

Образец цитирования:

М.П. Костинов, Н.Д. Абрамова, В.Н. Осипцов,
В.Р. Татевосов, В.В. Гайнитдинова, Н.О. Крюкова,
И.А. Баранова, Е.А. Хромова, Е.С. Коровкина,
А.Г. Чучалин, О.А. Свитич, К.В. Машилов
«Секреторный IgA у пациентов с COVID-19 при
различных способах применения поликомпонентной
вакцины «Иммуновак-ВП-4» // Российский
иммунологический журнал, 2023. Т. 26, № 4. С. 657-664.
doi: 10.46235/1028-7221-13541-SII

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

For citation:

M.P. Kostinov, N.D. Abramova, V.N. Osiptsov, V.R. Tatevosov,
V.V. Gainitdinova, N.O. Kryukova, I.A. Baranova,
E.A. Khromova, E.S. Korovkina, A.G. Chuchalin, O.A. Svitich,
K.V. Mashilov "Secretory IgA in patients with COVID-19
at different regimens of using multicomponent vaccine
Immunovac-VP-4", Russian Journal of Immunology/
Rossiyskiy Immunologicheskiy Zhurnal, 2023, Vol. 26, no. 4,
pp. 657-664. doi: 10.46235/1028-7221-13541-SII

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

DOI: 10.46235/1028-7221-13541-SII

Через 14 дней после начала наблюдения динамика уровня sIgA в назальном соскобе sIgA в 1-й группе статистически значимо снизилась относительно исходных значений ($p = 0,02$), в то время как в группе пациентов, получавших «Иммуновак-ВП-4» дополнительно к базовой терапии, уровень sIgA в указанный период оставалась без изменений ($p = 0,07$). Динамика уровня sIgA в фарингеальном соскобе в группе пациентов, получавших только базовую терапию, оставалась без статистически значимых изменений на всем периоде исследования. В то время как в группе пациентов, получавших базовую терапию, дополненную «Иммуновак-ВП-4», отмечается статистически значимый рост уровня sIgA на 30-й день наблюдения относительно исходного уровня ($p = 0,02$). Уровень sIgA в секрете слюнных желез статистически значимо не различался между группами исследования на всем периоде наблюдения.

Результаты исследования показали, что для оценки состояния мукозального иммунитета у пациентов с COVID-19 целесообразно определять sIgA в назальном секрете. Назначенный в комплексной терапии «Иммуновак-ВП-4» сопровождается повышением уровня sIgA на слизистых респираторного тракта.

Ключевые слова: sIgA, COVID-19, «Иммуновак-ВП-4», мукозальный иммунитет, бактериальные вакцины, иммунокоррекция

SECRETORY IgA IN PATIENTS WITH COVID-19 AT DIFFERENT REGIMENS OF USING MULTICOMPONENT VACCINE IMMUNOVAC-VP-4

Kostinov M.P.^{a, b}, Abramova N.D.^a, Osiptsov V.N.^c, Tatevosov V.R.^c, Gainitdinova V.V.^b, Kryukova N.O.^d, Baranova I.A.^d, Khromova E.A.^a, Korovkina E.S.^a, Chuchalin A.G.^d, Svitich O.A.^a, Mashilov K.V.^a

^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

^c Main Military Clinical Hospital of the Russian National Guard Troops, Balashikha, Moscow Region, Russian Federation

^d N. Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russian Federation

Abstract. The mucosal immunity performs an important function in prevention of respiratory infections including COVID-19. The search for approaches to activate the synthesis of post-infectious antibodies by correcting the factors of innate and adaptive immunity at mucous membranes of respiratory tract in patients with infection caused by the new coronavirus may be relevant for the treatment of patients with COVID-19. The aim of our study was to assess the concentrations of sIgA in the upper respiratory tract in patients with a confirmed diagnosis of Coronavirus infection caused by the COVID-19, and to evaluate the effect of an immunostimulating drug of bacterial origin upon the sIgA secretion.

The patients were divided into two groups: group 1 ($n = 45$), received basic therapy; group 2 ($n = 33$), in addition to basic therapy, received the bacterial vaccine Immunovac-VP-4 according to a combined scheme. The biomaterial sampling was carried out by scraping of epithelial cells from the nasal mucosa, pharyngeal scraping and salivary gland secretion on days 1, 14 and 30 of the study. sIgA levels in all biological fluids were studied using ELISA technique (JSC Vector-Best, Russia).

14 days after the start of observation, the dynamics of sIgA levels in nasal scrapings in group 1 showed a significant decrease relative to the baseline values ($p = 0.02$), whereas the level of sIgA remained unchanged during the specified period ($p = 0.07$) in the group of patients receiving, along with basic therapy, additional Immunovac-VP-4 treatment. The dynamics of sIgA level in pharyngeal scrapings in the group of patients receiving only basic therapy did not change throughout the study period. Meanwhile, the group of patients receiving basic therapy supplemented with Immunovac-VP-4 showed a significant increase in sIgA levels by the 30th day of follow-up over the baseline values ($p = 0.02$). The level of sIgA in salivary gland secretions did not differ significantly between the study groups during the entire follow-up period.

The results of our study showed that, in order to assess the state of mucosal immunity in patients with COVID-19, one may recommend determination of sIgA in nasal secretions. The Immunovac-VP-4 prescribed in complex therapy is accompanied by an increase in the sIgA levels at the mucous surfaces of the respiratory tract.

Keywords: sIgA, COVID-19, Immunovac-VP-4, mucosal immunity, bacterial vaccines, immunocorrection

Введение

Иммунитет слизистых оболочек выполняет важнейшую функцию в профилактике респираторных инфекций, к которым относится и возбудитель новой коронавирусной инфекции. Можно предположить, что индукция иммунитета слизистой оболочки в перспективе станет одной из стратегий в вакцинопрофилактике и терапии конкретной инфекции, например, SARS-CoV-2. Активация синтеза sIgA в назальном секрете может способствовать усилению механизмов мукозального иммунного ответа и благоприятному течению и исходу COVID-19. Согласно результатам ранее проведенных клинических исследований, большинство иммуномодулирующих препаратов микробного происхождения демонстрируют высокую безопасность и снижение активности проявлений инфекций дыхательных путей. В ряде случаев их применение позволяет снизить количество назначаемых антибиотиков и других препаратов с сохранением эффективности терапии [3]. Считается, что распознавание дендритными клетками бактериальных антигенов в составе подобных препаратов приводит к активации иммунного ответа и выработке антител В-клетками, при этом повышается фагоцитарная активность макрофагов, полиморфноядерных нейтрофилов, увеличивается продукция лизоцима и секреторного компонента IgA (sIgA) [4]. Введение иммуномодуляторов бактериальной природы приводит к поляризации иммунного ответа, преимущественно по Th1-типу, отмечается повышение цитотоксичности NK-клеток, увеличение экспрессии TLR-2, TLR-4 и TLR-9 [2]. Высказываются предположения, что назначение бактериальных лигандов в комплексной терапии позволяет поддерживать повышенное содержание sIgA на период лечения [8], а активация синтеза sIgA, выявляемого в назальном секрете, может способствовать усилению механизмов мукозального иммунного ответа и благоприятному течению и исходу COVID-19.

Таким образом, поиск подходов к активации синтеза постинфекционных антител посредством коррекции факторов врожденного и адаптивного иммунитета на уровне слизистых оболочек респираторного тракта у пациентов с инфекцией, вызванной новым коронавирусом, может оказаться актуальным в лечении пациентов с COVID-19 [7].

Цель исследования – изучение концентрации sIgA в верхних отделах респираторного тракта у пациентов с подтвержденным диагнозом «коронавирусная инфекция, вызванная вирусом COVID-19» и анализ влияния иммуностимулирующего препарата бактериального происхождения на секрецию sIgA.

Материалы и методы

Инфекция SARS-CoV-2 подтверждалась методом ПЦР мазка из носоглотки. Отбор пациентов

проводился после предварительно проведенных исследований и осмотра врача с учетом критериев включения и исключения. Вся информация о проведенном лечении, данных осмотра и проводимых исследованиях фиксировалась в официальной стандартной индивидуальной медицинской документации пациента.

Случайным образом пациенты были распределены на две группы: 1-я группа (n = 45), средний возраст: $45,2 \pm 13,8$ года, мужчины/женщины (30/15), получали базисную терапию в соответствии с клиническими рекомендациями Минздрава Российской Федерации: «Временные методические рекомендации – профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19)»; 2-я группа пациентов (n = 33), средний возраст $41,9 \pm 9,9$ года, мужчины/женщины (24/9), дополнительно к базисной терапии получали иммуностимулирующий препарат бактериального происхождения – вакцину «Иммуновак-ВП-4», назначенную с первого дня госпитализации с учетом показаний и противопоказаний согласно инструкции к препарату.

Вакцина «Иммуновак-ВП-4» – вакцина из антигенов условно-патогенных микроорганизмов поликомпонентная (смесь водоразводимых антигенов микробных клеток *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Escherichia coli*). Препарат разрешен к применению для назально-перорального введения ЛСР-001293/10 от 24.02.2010 (производство ФГУП «НПО «Микроген», г. Уфа, Россия). Препарат применялся по комбинированной схеме: интраназально, затем внутрь (*per os*): по 2 мл (20 мг) *per os* и по 2 капли (1 мг) интраназально в каждую половину носа ежедневно с 1-го по 10-й день нахождения в стационаре.

У всех больных оценивались демографические показатели, индекс массы тела, симптомы заболевания, данные объективного, лабораторного (общий анализ крови, С-реактивный белок, коагулограмма) и инструментального (компьютерная томография органов грудной клетки, пульсоксиметрия) методов исследования

Взятие биоматериала

У пациентов брались пробы: соскоб эпителиальных клеток со слизистой оболочки носовой полости, фарингеальный соскоб и секрет слюнных желез. Отбор слюны проводили ранним утром, перед чисткой зубов и приемом пищи. Слюну собирали при пассивном слюноотделении, без кашля под контролем врача [9, 10]. Забор биоматериала осуществлялся на 1-й день исследования до начала терапии, на 14-й день исследования перед выпиской из стационара и через 30 дней от начала терапии.

Уровни sIgA во всех биологических жидкостях были исследованы с помощью метода твердофазного иммуноферментного анализа (АО «Вектор-Бест», Россия). Регистрацию результатов проводили на иммуноферментном фотоме-

ТАБЛИЦА 1. АНАЛИЗ ДИНАМИКИ УРОВНЯ sIgA В ГРУППАХ СРАВНЕНИЯ У ПАЦИЕНТОВ С COVID-19 И ПОРАЖЕНИЕМ ЛЕГКИХ СРЕДНЕЙ СТЕПЕНИ ТЯЖЕСТИ, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 1. ANALYSIS OF THE DYNAMICS OF sIgA LEVELS IN COMPARISON GROUPS IN PATIENTS WITH COVID-19 AND MODERATE LUNG DAMAGE, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

Группы исследования Research groups	sIgA в контрольных точках, мкг/л sIgA at control points, µg/L			p-динамика ⁵ p dynamics ⁵
	До Before	Через 14 дней 14 days after	Через 30 дней 30 days after	
Назальный соскоб – норма 29,9 мкг/л Nasal scraping – the norm is 29.9 µg/L				
Контроль ¹ Control ¹	96,3 (58,6-167,5,0)	59,0 (21,9-138,1)	37,3 (8,4-66,9)	p ⁰⁻¹⁴ = 0,02 p ¹⁴⁻³⁰ = 0,04 p ⁰⁻³⁰ = 0,007
ВП-4 ² VP-4 ²	77,7 (48,4-98,7)	60,2 (23,3-102,9)	113,4 (39,8-156,7)	p ⁰⁻¹⁴ = 0,07 p ¹⁴⁻³⁰ = 0,03 p ⁰⁻³⁰ = 0,05
p-группа p group	p = 0,14	p = 0,23	p = 0,02	–
LMEM³ – Группа: F = 0,8, p (78,0) = 0,44, Время: F = 0,6, p (45,9) = 0,43, Группа × Время: F = 7,9, p (78,0) < 0,001 LMEM ³ – Group: F = 0.8, p (78.0) = 0.44, Time: F = 0.6, p (45.9) = 0.43, Group × Time: F = 7.9, p (78.0) < 0.001				
Фарингеальный соскоб – норма 6,5 мкг/л Pharyngeal scraping – the norm is 6.5 µg/L				
Контроль Control	6,6 (1,3-37,9)	5,3 (0,3-16,4)	2,9 (0,4-14,8)	p ⁰⁻¹⁴ = 0,17 p ¹⁴⁻³⁰ = 0,36 p ⁰⁻³⁰ = 0,12
ВП-4 VP-4	1,5 (0,2-16,5)	5,7 (0,4-13,5)	29,8 (3,6-106,8)	p ⁰⁻¹⁴ = 0,22 p ¹⁴⁻³⁰ = 0,07 p ⁰⁻³⁰ = 0,02
p-группа p group	p = 0,12	p = 0,45	p = 0,05	–
LMEM⁴ – Группа: F = 0,3, p (49,4) = 0,57, Время: F = 1,8, p (73,0) = 0,17, Группа × Время: F = 6,5, p (73,0) = 0,003 LMEM ⁴ – Group: F = 0.3, p (49.4) = 0.57, Time: F = 1.8, p (73.0) = 0.17, Group × Time: F = 6.5, p (73.0) = 0.003				
Секрет слюнных желез – норма 71,7 мкг/л Secret of the salivary glands is the norm of 71.7 µg/L				
Контроль Control	169,4 (84,6-237,1)	130,6 (93,2-181,2)	126,7 (99,9-164,3)	–
ВП-4 VP-4	168,7 (95,8-233,8)	140,6 (86,4-213,4)	154,6 (121,0-200,3)	–
LMEM – Группа: F = 0,2, p (41,6) = 0,65, Время: F = 0,7, p (66,3) = 0,52, Группа × Время: F = 0,3, p (66,3) = 0,75 LMEM – Group: F = 0.2, p (41.6) = 0.65, Time: F = 0.7, p (66.3) = 0.52, Group × Time: F = 0.3, p (66.3) = 0.75				

Примечание. ¹ – группа базисной терапии. ² – группа базисной терапии + «Иммуновак-ВП-4» (ВП-4). ³ – применялась смешанная линейная модель, где группа и время – фиксированные факторы, отдельные пациенты – случайные. Представлены результаты, обобщенные для трех временных точек с применением ANOVA (III тип) с аппроксимацией степеней свободы методом Кенварда–Роджера. ⁴ – расчеты проводились на предварительно трансформированных данных, применялся метод Бокса–Кокса, параметр $\lambda = -0,13$. ⁵ – апостериорные тесты (между контрольными точками – «p-динамика» и между группами в каждой контрольной точке – «p-группа») проводились с помощью построения соответствующих контрастов в рамках рассчитанной смешанной линейной модели, применялась поправка Бенджамина–Крюгера–Иекутиели.

Note. ¹, group of basic therapy. ², group of basic therapy + Immunovac-VP-4 (VP-4). ³, a mixed linear model was used, where the group and time are fixed factors, individual patients are random. The results generalized for three time points using ANOVA (type III) with approximation of degrees of freedom by the Kenward–Roger method are presented. ⁴, calculations were carried out on pre-transformed data, the Box–Cox method was used, the parameter $\lambda = -0.13$. ⁵, a posteriori tests (between control points – “p dynamics” and between groups at each control point – “p group”) were carried out by constructing appropriate contrasts within the framework of the calculated mixed linear model, the Benjamin–Krugger–Iekutieli correction was applied.

тре микропланшетного типа Мультискан Ascent (Thermo Electron Corporation, Финляндия). Метод определения основан на двухстадийном «сэндвич»-методе твердофазного иммуноферментного анализа с применением моноклональных антител к секреторному компоненту а-цепи IgA. Калибровочные пробы с известной концентрацией sIgA и анализируемые образцы инкубируются в лунках планшета с иммобилизованными моноклональными антителами к sIgA. Степень окраски пропорциональна концентрации sIgA в анализируемом образце. После измерения величины оптической плотности раствора в лунках на основании калибровочного графика рассчитывалась концентрация sIgA в анализируемых образцах.

Работа выполнена с использованием сертифицированного оборудования центра коллективного пользования ФГБНУ «НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова».

Статистическую обработку данных проводили с помощью пакета программ Statistica для Windows 10.0 и Microsoft Excel 2007. Различия считались статистически достоверными при $p < 0,05$.

Протокол исследования был утвержден 26 ноября 2020 г. локальным Этическим комитетом ФГБНУ «НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова» (Россия).

Результаты и обсуждение

Клиническое наблюдение за пациентами не позволило зарегистрировать развитие каких-либо системных или местных реакций, связанных с приемом препарата «Иммуновак-ВП-4».

Уровень sIgA в группе госпитализированных пациентов с COVID-19, получавших только базисную терапию, и в группе пациентов, получавших базисную терапию, дополненную «Иммуновак-ВП-4», представлен в таблице 1. Динамика уровня sIgA в назальном соскобе пациентов с пневмонией средней тяжести статистически значимо различалась в зависимости от применяемой терапии ($F = 7,9$, $p(78,0) < 0,001$) (рис. 1). Через 14 дней после начала наблюдения данный показатель в группе контроля статистически значимо снизился относительно исходных значений (с 96,3 (58,6-167,5) мкг/л до 59,0 (21,9-138,1) мкг/л, $p = 0,02$), в то время как в группе пациентов, получавших «Иммуновак-ВП-4» дополнительно к базовой терапии, уровень sIgA в указанный период оставался без изменений ($p = 0,07$). Через 30 дней после начала лечения уровень sIgA в группе пациентов, получавших «Иммуновак-ВП-4», статистически значимо вырос, как по сравнению с исходными значениями (с 77,7 (40,5-98,7) мкг/л до 113,4 (39,8-156,7) мкг/л, $p = 0,05$), так и по сравнению со значениями, измеренными на 14-й день лечения (с 60,2 (23,3-102,9) мкг/л до 113,4 (39,8-156,7) мкг/л, $p = 0,03$). В контрольной группе на

30-й день наблюдения уровень sIgA в назальной полости, напротив, статистически значимо снизился до 37,3 (8,4-66,9) мкг/л (с 99,9 (58,6-178,0) мкг/л исходно – $p = 0,007$ и с 59,0 (21,9-138,1) мкг/л на 14-й день лечения – $p = 0,04$). Таким образом, относительно исходных значений, через 30 дней после начала лечения уровень sIgA в назальной области в группе контроля снизился на 60 (от -115,4 до -3,5) мкг/л, а в группе «Иммуновак-ВП-4» вырос на +22,1 (от +1,8 до 89,8) мкг/л, различия дельты показателя между группами статистически значимы ($p = 0,003$). В результате данных изменений, через 30 дней после начала лечения, уровень sIgA в группе пациентов, получавших ВП-4 дополнительно к базовой терапии, стал статистически значимо выше, чем у пациентов, получавших только базовую терапию: 113,4 (39,8-156,7) мкг/л против 37,3 (8,4-66,9) мкг/л, $p = 0,05$. Относительно нормативных значений уровень sIgA в назальной полости у пациентов, получавших ВП-4, был выше в течение всего периода наблюдения ($p < 0,001$ исходно, $p = 0,03$ через 14 суток, $p = 0,01$ через 30 суток).

Динамика уровня sIgA в фарингеальном соскобе статистически значимо отличалась или изменялась в зависимости от применяемой терапии ($F = 6,5$, $p(73,0) = 0,003$) (рис. 2). В группе пациентов, получавших только базовую терапию, динамика анализируемого показателя оставалась без статистически значимых изменений на всем периоде исследования ($p = 0,17$ через 14 суток, $p = 0,12$ через 30 суток относительно исходных значений). В то время как в группе пациентов, получавших базовую терапию, дополненную «Иммуновак-ВП-4», отмечается статистически значимый рост уровня sIgA в фарингеальной полости на 30-й день наблюдения относительно исходного уровня: с 1,5 (0,2-16,5) мкг/л до 29,8 (3,6-106,8) мкг/л ($p = 0,02$). Изменение дельта показателя на 30-й день по сравнению с исходным уровнем в группе «Иммуновак-ВП-4» составило +27,8 (от +0,3 до +221,7) мкг/л против -0,5 (от -14,2 до +2,8) мкг/л в группе контроля ($p = 0,003$). В результате описанных изменений уровень sIgA в фарингеальном соскобе через 30 дней после начала терапии стал статистически значимо выше в группе пациентов, получавших «Иммуновак-ВП-4», по сравнению с группой контроля: 29,8 (3,6-106,8) мкг/л против 2,9 (0,4-14,8) мкг/л ($p = 0,05$). По сравнению с нормативными значениями статистически значимых отличий ни в одной группе исследования выявлено не было.

Уровень sIgA в секрете слюнных желез статистически значимо не различался между группами исследования на всем периоде наблюдения ($F = 0,2$, $p(41,6) = 0,65$), динамика показателя в группах исследования также статистически значимо не различалась ($F = 0,3$, $p(66,3) = 0,75$).

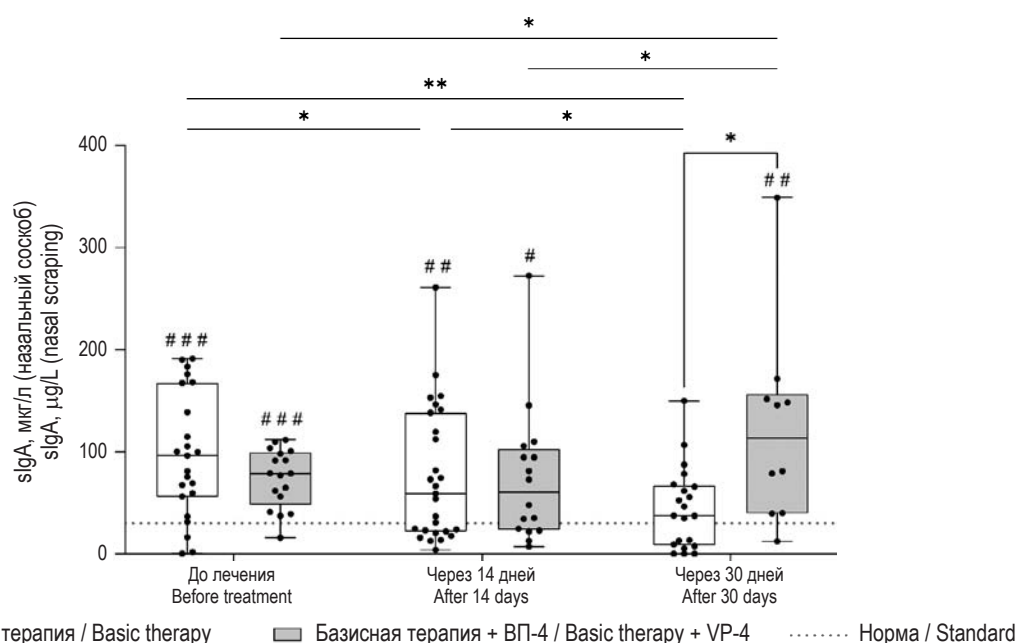


Рисунок 1. Динамики уровня sIgA в назальном соскобе в группе пациентов с пневмонией средней степени тяжести, получавших только базисную терапию и группе пациентов получавших базисную терапию, дополненную «Имуновак-ВП-4» (исходно, через 14 и 30 дней), приведены индивидуальные значения, медиана, интерквартильный размах, минимальное и максимальное значение

Примечание. * – $p \leq 0,05$, ** – $p < 0,01$ применялась линейная смешанная модель, для множественных сравнений применялась коррекция Бенджамина–Крюгера–Иекутиели; ### – $p < 0,001$ по сравнению с нормой (здоровыми непривитыми участниками исследования) применялся одновыборочный критерий Вилкоксона.

Figure 1. Dynamics of the level of sIgA in nasal scraping in a group of patients with moderate pneumonia receiving only basic therapy and a group of patients receiving basic therapy supplemented with Immunovac-VP-4 (initially, after 14 and 30 days), individual values, median, interquartile range, minimum and maximum values are given

Note. *, $p \leq 0.05$; **, $p < 0.01$ a linear mixed model was used, the Benjamin–Kruger–Iekutieli correction was used for multiple comparisons; ###, $p < 0.001$; compared to the norm (healthy unvaccinated study participants), a single-sample Wilcoxon criterion was used.

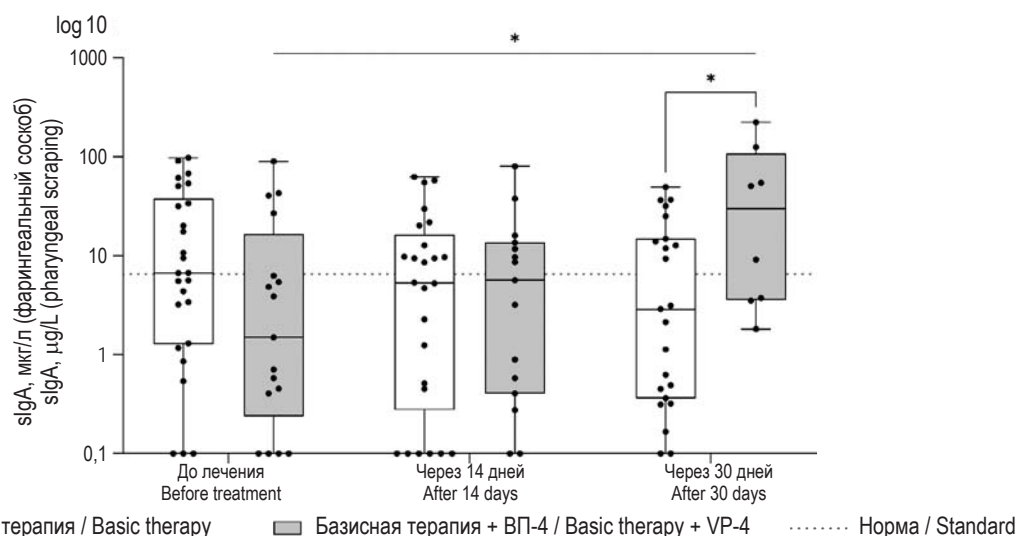


Рисунок 2. Динамики уровня sIgA в фарингеальном соскобе в группе пациентов с пневмонией средней степени тяжести, получавших только базисную терапию и группе пациентов получавших базисную терапию, дополненную ВП-4 (исходно, 14 и через 30 дней), приведены индивидуальные значения, медиана, интерквартильный размах, минимальное и максимальное значение

Примечание. * – $p \leq 0,05$ применялась линейная смешанная модель, для множественных сравнений применялась коррекция Бенджамина–Крюгера–Иекутиели.

Figure 2. Dynamics of the sIgA level in pharyngeal scraping in a group of patients with moderate pneumonia who received only basic therapy and a group of patients who received basic therapy supplemented with VP-4 (initially, 14 and after 30 days), individual values, median, interquartile range, minimum and maximum values are given

Note. *, $p \leq 0.05$ a linear mixed model was used, the Benjamin–Kruger–Iekutieli correction was used for multiple comparisons.

Заключение

Индукция антител слизистой оболочки является ключевым компонентом в снижении выделения вируса после инфекции и может опосредовать защитный иммунитет после повторного воздействия. Разработка вакцин против SARS-CoV-1, нацеленных на слизистые оболочки, на моделях животных показали, что вирус-специфический IgA слизистых опосредует защиту от последующего воздействия CoV дикого типа [5, 6]. В проведенном исследовании был доказан положительный эффект терапии вакциной, содержащей антигенные компоненты *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Escherichia coli*, обладающих иммуногенной активностью, который по результатам настоящего исследования характеризовался также восстановлением уровня sIgA в назальном и фарингиальном соскобе у пациентов, перенесших COVID-19. Быстрое восстановление одного из важных параметров – sIgA – мукозального иммунитета по-

сле перенесенной COVID-19 и создание защиты от любого патогена путем стимуляции системы врожденного иммунитета с помощью препаратов микробного происхождения, несущих консервативные, присущие только микроорганизмам патоген-ассоциированные молекулярные структуры, которые распознаются рецепторами иммунной системы, приводит к выявлению патогена (сигнал опасности), активации эффекторных механизмов защиты в течение нескольких часов и запуску процессов, ведущих к элиминации патогена и формированию протективного (адаптивного) иммунитета в течение 7-14 дней [1, 2]. Таким образом, результаты исследования показали, что для оценки состояния мукозального иммунитета у пациентов с COVID-19 целесообразно определять sIgA в назальном секрете. Назначенный в комплексной терапии иммуностимулирующий препарат микробного происхождения «Иммуновак-ВП-4» сопровождается повышением уровня sIgA на слизистых респираторного тракта и клиническим улучшением заболевания.

Список литературы / References

1. Коровкина Е.С., Кажарова С.В. Роль TOLL-подобных рецепторов в патогенезе воспалительных заболеваний бронхолегочной системы // *Инфекция и иммунитет*, 2016. Т. 6, № 2. С. 109-116. [Korovkina E.S., Kazharova S.V. The Toll-like receptors role in inflammatory diseases of the bronchopulmonary system pathogenesis. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2016, Vol. 6, no. 2, pp. 109-116. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-2016-2-109-116.
2. Коровкина Е.С., Костинов М.П. Иммунопатологические механизмы внебольничной пневмонии и хронической обструктивной болезни легких, обусловленные инфекционной патологией этих заболеваний, и пути возможной иммунокоррекции // *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*, 2019. № 2. С. 100-109. [Korovkina E.S., Kostinov M.P. Immune mechanisms of community-acquired pneumonia and COPD due to infectious etiology and methods of immunotherapy. *Zhurnal mikrobiologii epidemiologii i immunologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2019, no. 2, pp. 100-109. (In Russ.)]
3. Костинов М.П., Татевосов В.Р., Протасов А.Д., Гайнитдинова В.В., Сизов А.В. Вакцинация против *Staphylococcus aureus* и некоторых представителей семейства Enterobacteriaceae в комплексном лечении внебольничной пневмонии легкого течения у военнослужащих нового пополнения // *Медицинский вестник МВД*, 2021. Т. 115, № 6. С. 23-29. [Kostinov M.P., Tatevosov V.P., Protasov A.D., Gainitdinova V.V., Sizov A.V. Vaccination against *Staphylococcus aureus* and some Enterobacteriaceae in the complex treatment of mild community-acquired pneumonia in conscript servicemen. *Meditsinskiy vestnik MVD = Medical Bulletin of the Ministry of Internal Affairs*, 2021, Vol. 115, no. 6, pp. 23-29. (In Russ.)]
4. Chang S.Y., Ko H.J., Kweon M.N. Mucosal dendritic cells shape mucosal immunity. *Exp. Mol. Med.*, 2014, Vol. 46, no. 3, e84. doi: 10.1038/emm.2014.16.
5. Liew F.Y., Russell S.M., Appleyard G., Brand C.M., Beale J. Cross-protection in mice infected with influenza A virus by the respiratory route is correlated with local IgA antibody rather than serum antibody or cytotoxic T cell reactivity. *Eur. J. Immunol.*, 1984, Vol. 14, no. 4, pp. 350-356.
6. Pasomsub E., Watcharananan S.P., Boonyawat K., Janchompoo P., Wongtabtim G., Suksuwan W., Sungkanuparph S., Phuphuakrat A. Saliva sample as a non-invasive specimen for the diagnosis of coronavirus disease 2019: a cross-sectional study. *Clin. Microbiol. Infect.*, 2021, Vol. 27, no. 2, p. 285.e1-285.e4.
7. Schaad U.B. Prevention of pediatric respiratory tract infections: emphasis on the role of OM-85. *Eur. Respir. Rev.*, 2005, no. 14, pp. 74-77.
8. Svitich O.A., Abramova N.D., Bisheva I.V., Khromova E.A., Skhodova S.A., Kryukova N.O., Baranova I.A., Chuchalin A.G., Polishchuk V.B., Pakhomov D.V., Osiptsov V.N., Tatevosov V.R., Yurinskaya M.L., Kostinov M.P. The level of sIgA in nasal secretions and the incidence of complications in hospitalized patients with COVID-19 against an immunotropic drug. *ERJ Open Res.*, 2022, no. 8, 258. doi: 10.1183/23120541.LSC-2022.258.
9. Tajima Y., Suda Y., Yano K. A case report of SARS-CoV-2 confirmed in saliva specimens up to 37 days after onset: proposal of saliva specimens for COVID-19 diagnosis and virus monitoring. *J. Infect. Chemother.*, 2020, Vol. 26, no. 10, pp. 1086-1089.
10. To K.K.-W., Tsang O.T.-Y., Leung W.-S., Tam A.R., Wu T.-C., Lung D.C., Yip C.C.-Y., Cai J.-P., Chan J.M.-C., Chik T.S.-H., Lau D.P.-L., Choi C.Y.-C., Chen L.-L., Chan W.-M., Chan K.-H., Ip J.D., Ng A.C.-K., Poon R.W.-S., Luo C.-T., Cheng V.C.-C., Chan J.F.-W., Hung I.F.-N., Chen Z., Chen H., Yuen K.-Y. Temporal profiles of viral load in posterior oropharyngeal saliva samples and serum antibody responses during infection by SARS-CoV-2: an observational cohort study. *Lancet Infect. Dis.*, 2020, Vol. 20, no. 5, pp. 565-574.

Авторы:

Костинов М.П. — д.м.н., профессор, член-корр. РАН, заведующий лабораторией вакцинопрофилактики и иммунотерапии аллергических заболеваний ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова»; заведующий кафедрой эпидемиологии и современных технологий вакцинации ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» (Сеченовский университет), Москва, Россия

Абрамова Н.Д. — младший научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

Осипцов В.Н. — подполковник, старший терапевт ФГКУЗ «Главный военный клинический госпиталь войск национальной гвардии Российской Федерации», г. Балашиха, Московская обл., Россия

Татевосов В.Р. — подполковник, врач-терапевт ФГКУЗ «Главный военный клинический госпиталь войск национальной гвардии Российской Федерации», г. Балашиха, Московская обл., Россия

Гайнитдинова В.В. — д.м.н., профессор кафедры пульмонологии ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» (Сеченовский университет), Москва, Россия

Крюкова Н.О. — аспирант, ассистент кафедры госпитальной терапии педиатрического факультета ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Баранова И.А. — д.м.н., профессор кафедры госпитальной терапии педиатрического факультета ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Хромова Е.А. — к.м.н., научный сотрудник лаборатории вакцинопрофилактики и иммунотерапии аллергических заболеваний ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

Коровкина Е.С. — к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории аллергодиагностики ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

Чучалин А.Г. — д.м.н., профессор, академик РАН, заведующий кафедрой госпитальной терапии педиатрического факультета ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Свитич О.А. — д.м.н., профессор, член-корр. РАН, директор ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

Машилов К.В. — к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории вакцинопрофилактики и иммунотерапии аллергических заболеваний ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

Authors:

Kostinov M.P., PhD, MD (Medicine), Professor, Corresponding Member, Russian Academy of Sciences, Head, Laboratory of Vaccination and Immunotherapy of Allergic Diseases, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera; Head, Department of Epidemiology and Modern Technologies of Vaccination, I. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation

Abramova N.D., Junior Research Assistant, Laboratory of Molecular Immunology, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

Osiptsov V.N., Lieutenant Colonel, Senior Therapist, Main Military Clinical Hospital of the Russian National Guard Troops, Balashikha, Moscow Region, Russian Federation

Tatevosov V.R., Lieutenant Colonel, Doctor-Therapist, Main Military Clinical Hospital of the Russian National Guard Troops, Balashikha, Moscow Region, Russian Federation

Gainitdinova V.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Pulmonology Department, I. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation

Kryukova N.O., Postgraduate Student, Assistant Professor, Department of Hospital Therapy, Faculty of Pediatrics, N. Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russian Federation

Baranova I.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Hospital Therapy, Faculty of Pediatrics, N. Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russian Federation

Khromova E.A., PhD (Medicine), Research Associate, Laboratory of Vaccine Prevention and Immunotherapy of Allergic Diseases, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

Korovkina E.S., PhD (Medicine), Senior Research Associate, Laboratory of Allergodiagnosics, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

Chuchalin A.G., PhD, MD (Medicine), Professor, Full Member, Russian Academy of Sciences, Head, Department of Hospital Therapy, Faculty of Pediatrics, N. Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russian Federation

Svitich O.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Corresponding Member, Russian Academy of Sciences, Director, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

Mashilov K.V., PhD (Medicine), Senior Research Associate, Laboratory of Vaccine Prevention and Immunotherapy of Allergic Diseases, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

СРАВНЕНИЕ ИММУННОГО ОТВЕТА НА РАЗЛИЧНЫЕ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ SARS-CoV-2 В ТЕЧЕНИЕ 6 МЕСЯЦЕВ ПОСЛЕ НАЧАЛА ВАКЦИНАЦИИ И ПОСЛЕ РЕВАКЦИНАЦИИ

Астраханцева И.В.

Научный центр генетики и наук о жизни АНО ВО «Университет “Сириус”», г. Сочи, Краснодарский край, Россия

Резюме. Пандемия коронавирусной инфекции (COVID-19) стимулировала разработку, испытания и широкое применение профилактических вакцин, созданных на различных платформах. Нами было проведено прямое сравнение иммуногенности различных вакцин на небольших группах в одном исследовании в течение шести месяцев после вакцинации и ревакцинации.

Иммунный статус вакцинированных аденовирусной вакциной «Спутник V», мРНК вакцинами и цельновирионной вакциной «КовиВак» был оценен с помощью иммуноферментного анализа. С помощью клеточной тест-системы с использованием псевдовирусной технологии была проведена оценка нейтрализующей способности антител.

Все вышеупомянутые вакцины вызывали иммунный ответ против RBD SARS-CoV-2, однако титр антител и их нейтрализующая способность отличались в зависимости от типа вакцины. Наиболее иммуногенными оказались мРНК вакцины, эффективность иммунного ответа на аденовирусную вакцину «Спутник V» была ниже, однако через 6 месяцев после вакцинации эффективность нейтрализации вируса антителами индуцированными этими вакцинами не отличалась. Цельновирионная вакцина «КовиВак», эффективность которой была подтверждена в независимых эпидемиологических исследованиях, в меньшей степени индуцировала антительный иммунный ответ против RBD-белка. Серопозитивные участники исследования, как ранее перенесшие заболевание COVID-19, так и вакцинированные, характеризовались выработкой антител в высоком титре уже после первой дозы вакцины «Спутник V» и значительно более высоким титром антител через 6 месяцев после повторной иммунизации по сравнению с начальным уровнем антител, при этом титр антител прямо коррелировал с их нейтрализующей активностью.

Ключевые слова: вакцинация, коронавирус, антитела, ревакцинация, иммунный ответ, нейтрализующие антитела

Адрес для переписки:

*Астраханцева Ирина Владимировна
Научный центр генетики и наук о жизни АНО ВО
«Университет “Сириус”»
354340, Краснодарский край, г. Сочи,
Адлерский район, ул. Ленина, 2, а/я 234.
Тел.: 8 (862) 241-98-44.
E-mail: astrakhantsevairina@gmail.com*

Address for correspondence:

*Irina V. Astrakhantseva
2 Lenin St, p/o 234
Sochi, Krasnodar Region
354340 Russian Federation
Phone: +7 (862) 241-98-44.
E-mail: astrakhantsevairina@gmail.com*

Образец цитирования:

И.В. Астраханцева «Сравнение иммунного ответа на различные вакцины против SARS-CoV-2 в течение 6 месяцев после начала вакцинации и после ревакцинации» // Российский иммунологический журнал, 2023. Т. 26, № 4. С. 665-670.

doi: 10.46235/1028-7221-13943-COI

© Астраханцева И.В., 2023

*Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0*

For citation:

I.V. Astrakhantseva “Comparison of immune response to various SARS-CoV-2 vaccines within 6 months after starting vaccination and following revaccination”, Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2023, Vol. 26, no. 4, pp. 665-670.

doi: 10.46235/1028-7221-13943-COI

© Astrakhantseva I.V., 2023

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

DOI: 10.46235/1028-7221-13943-COI

COMPARISON OF IMMUNE RESPONSE TO VARIOUS SARS-CoV-2 VACCINES WITHIN 6 MONTHS AFTER STARTING VACCINATION AND FOLLOWING REVACCINATION

Astrakhantseva I.V.

Center of Genetics and Life Sciences, Sirius University, Sochi, Krasnodar Region, Russian Federation

Abstract. The pandemic of coronavirus infection (COVID-19) has stimulated the development, testing and widespread use of preventive vaccines based on various platforms. Our aim was to perform a direct comparison of immunogenicity of various vaccines within a single study in small groups within six months of SARS-CoV-2 vaccination and revaccination.

The study group included subjects vaccinated with Sputnik V adenovirus vaccine, mRNA vaccines, and CoviVac whole-virion vaccine. Their immune status was assessed by enzyme immunoassay as specific antibody levels. Moreover, the neutralizing ability of detected antibodies was assessed using a cell test system based on pseudoviral technology.

All of the mentioned vaccines were shown to elicit an immune response against SARS-CoV-2 RBD antigen, however, appropriate antibody titers and neutralizing capacities differed depending on the type of vaccine. The mRNA vaccines proved to be the most immunogenic, the effectiveness of the immune response to the Sputnik V adenovirus-based vaccine was lower. However, 6 months after vaccination, the effectiveness of virus neutralizing antibodies induced by these vaccines did not differ. The whole-virion CoviVac vaccine with proven efficiency by independent epidemiological studies, induced an antibody response against the RBD protein to a lesser extent.

The seropositive participants of the study, both previously exposed to COVID-19 disease or vaccinated, exhibited high-titer production of antibodies already after the first dose of the Sputnik V vaccine, and a significantly higher antibody titer 6 months after the booster immunization as compared with initial level of antibodies, along with direct correlation between the antibody titers and their neutralizing activity.

Keywords: vaccination, coronavirus, antibodies, revaccination, immune response, neutralizing antibodies

Финансирование проекта осуществлялось Министерством науки и высшего образования Российской Федерации (Соглашение № 075-10-2021-093; Проект ИМБ-НИР-2103).

Введение

За последние 20 лет три значимых эпидемии были вызваны β -коронавирусами SARS-CoV, MERS-CoV и SARS-CoV-2. Эти вирусы принадлежат к семейству коронавирусов (Coronaviridae), которое включает в себя оболочечные РНК вирусы с положительной полярностью, вызывающие инфекции верхних и нижних дыхательных путей [5, 9]. Наиболее значительной и масштабной стала пандемия COVID-19, вызванная вирусом SARS-CoV-2.

Противовирусный иммунный ответ на коронавирусную инфекцию стал изучаться многими исследовательскими группами после вспышки

SARS-CoV в 2002 году [10, 11, 12]. Нейтрализующие антитела и Т-клеточный ответ, главным образом, были направлены против S-белка, который участвует в распознавании рецептора и проникновении вируса в клетку-мишень и играет важную роль в адаптивной эволюции вируса [4].

Оказалось, что геном SARS-CoV-2 гомологичен геному SARS-CoV примерно на 79% [7]. В связи с этим большинство исследований, которые были сделаны в области разработки вакцин против SARS-CoV, могли быть применимы к новой коронавирусной инфекции. Это позволило менее чем за год, после идентификации нового патогена, выпустить в третью фазу испытаний целый спектр вакцин на различных платформах.

Целью данной работы было изучить наличие, длительность циркуляции и нейтрализующую активность антител, индуцированных «Спутником V» по сравнению с другими вакцинами.

Материалы и методы

Этика и сбор образцов. Проведение исследования было разрешено Комитетом по Биоэтике АНО ВО «Университет «Сириус» (протокол от 5.02.2021). Все участники исследования подписали информированное согласие на участие в исследовании до начала сбора биоматериала. Для выделения сыворотки периферическую кровь собирали в пробирки IMPROVacutainer с активатором свертывания объемом 5 мл (IMPROVE, КНР).

Подробная характеристика групп представлена в таблице 1.

Следуя рекомендациям Роспотребнадзора, часть участников (n = 18) прошли ревакцинацию, и их иммунных статус был также исследован.

Оценка уровня антител. С помощью иммуноферментной тест-системы «SARS-CoV-2-IgG-ИФА» (ФГБУ «НМИЦ Гематологии» Минздрава России, K153G) производилась оценка уровня антител против RBD согласно инструкции производителя. В образцах, показавших наличие

антител, проводили полуколичественную оценку их титра. Для этого исследуемые образцы титровали 3-кратными разведениями (1:100, 1:300, 1:900 т. д.), а затем наличие антител оценивали в той же тест-системе. Титром считали последнее разведение сыворотки, в котором детектировались антитела. Результаты представляли, как десятичный логарифм от определенного значения титра.

Оценка нейтрализации трансдукции PVPs проводилась, как описано ранее [1] для Уханьского варианта вируса.

Статистический анализ данных проводился с помощью GraphPad Prism 9.3.1.

Результаты и обсуждение

Спустя полтора месяца после первых симптомов ($49,2 \pm 12,3$ дней) у всех участников исследования, перенесших COVID-19 детектировались IgG-антитела против рецептор-связывающего домена вируса, при этом титры IgG были досто-

ТАБЛИЦА 1. ИССЛЕДУЕМЫЕ ГРУППЫ ДОБРОВОЛЬЦЕВ

TABLE 1. STUDY GROUPS OF VOLUNTEERS

Количество исследований Number of studies	Группа Group	SARS-CoV-2	Спутник V* Sputnik V*	SARS-CoV-2 Спутник V* SARS-CoV-2 Sputnik V*	КовиВак* CoviVac*	мРНК* (BNT162b2 или mRNA-1273) mRNA (BNT162b2 and mRNA-1273)
Участники (N) Participants (N)		36	42	24	20	20 (14+8)
Образцы перед второй дозой (N) Samples before second dose of vaccine (N)		–	11	13	6	–
1-я точка (дней, mean \pm SD/N) 1 st point (days, mean \pm SD/N)		49,2 \pm 12,3/13	47,8 \pm 5,7/27	54,0 \pm 6,2/17	40,4 \pm 6,4/19	53,3 \pm 10,4/12
2-я точка (дней, mean \pm SD/N) 2 nd point (days, mean \pm SD/N)		120,2 \pm 17,9/18	116,5 \pm 10,7/23	112,5 \pm 8,8/12	117,5 \pm 13,5/4	122,2 \pm 9,0/12
3-я точка (дней, mean \pm SD/N) 3 rd point (days, mean \pm SD/N)		216,4 \pm 26,4/17	217,1 \pm 21,1/23	217,5 \pm 24,3/14	174 \pm 31/4	232,2 \pm 20,8/8

Примечание. * – участники тестировались на наличие антител IgG против RBD SARS-CoV-2 перед вакцинацией, в случае если образец сыворотки перед вакцинацией был недоступен, оценивалось наличие антител к N-белку в последующих пробах.

Note. *, participants were tested for the presence of IgG antibodies against RBD SARS-CoV-2 before vaccination, if a pre-vaccination serum sample was not available, the presence of antibodies to N-protein in subsequent samples was assessed.

верно выше у участников, которые переболели 3-4 месяца или более 6 месяцев назад (рис. 1А, см. 3-ю стр. обложки).

В группе участников, вакцинированных мРНК вакцинами, максимальные титры IgG против RBD детектировались через полтора месяца ($53,3 \pm 10,4$ дней) после начала вакцинации с последующим плавным снижением в течение 7-8 месяцев (рис. 1А, см. 3-ю стр. обложки). У вакцинированных «Спутником V» наблюдался достаточно гетерогенный ответ, и, достоверных отличий в титре IgG против RBD между различными временными точками не наблюдалось (рис. 1А, см. 3-ю стр. обложки). Цельновирионная вакцина «КовиВак» вызывала детектируемый IgG ответ против RBD только у 35% (7/20) участников (рис. 1А, см. 3-ю стр. обложки) и титр был существенно ниже, чем в других исследуемых группах.

Однако способность к нейтрализации вируса максимальной через месяц после инфекции/вакцинации. Для вакцинированных мРНК вакцинами в первые три месяца была характерна высокая способность к нейтрализации вируса, что коррелировало с высокими титрами антител. К шести месяцам после вакцинации или инфекции во всех группах наблюдалось снижение нейтрализующей способности антител и не было существенных различий между группами (рис. 1Б, см. 3-ю стр. обложки).

У серопозитивных участников, которых вакцинировали «Спутником V», максимальный титр антител наблюдался уже после первой дозы вакцины. Также важно отметить, что даже через полгода после вакцинации титр антител и их нейтрализующая эффективность оставались существенно выше, чем до вакцинации (рис. 1В, см. 3-ю стр. обложки). Другой группой исследователей ранее было также показано, что одна доза вакцины «Спутника V» вызывала быстрый и сильный иммунный ответ у серопозитивных участников с нейтрализующими титрами, которые превышали таковые у серонегативных участников, получивших две дозы [8].

В связи с тем, что через шесть месяцев после вакцинации у большинства вакцинированных происходило существенное падение уровня антител к вирусу SARS-CoV-2, была рекомендована повторная вакцинация. У участников, первично вакцинированных «Спутником V», а затем также ревакцинированных той же вакциной, было отмечено существенное повышение титра IgG про-

тив RBD по крайней мере в течение трех месяцев после ревакцинации (рис. 1Г, слева; см. 3-ю стр. обложки), что сопровождалось резким повышением способности антител нейтрализовать вход вируса в клетку (рис. 1Г, справа; см. 3-ю стр. обложки).

Все изученные вакцины были иммуногенными, однако количественные параметры иммунных реакций различались. Цельновирионная вакцина «КовиВак» вызывала слабый ответ на RBD, что также коррелировало со слабой нейтрализацией трансдукции псевдовирусных частиц несущих S-белок (данные не показаны), однако ранее было продемонстрировано, что эта вакцина индуцирует высокий гуморальный ответ на S2 субъединицу белка шипа [1] и вызывает сильный Т-клеточный ответ на вирус, имеющий решающее значение, в том числе в нейтрализации варианта «Омикрон» (данные в печати). В то же время вакцины созданные как на платформе мРНК, так и на аденовирусной платформе («Спутник V») вызывали сильный антительный ответ на RBD домен. У вакцинированных «Спутником V» титры несущественно снижались в течение полугода, в то время как у вакцинированных мРНК вакцинами изначально высокие титры антител, к шести месяцам демонстрировали резкое снижение. Такое же наблюдение было сделано при сравнении векторной вакцины ChAdOx1-nCoV-19 (AstraZeneca) и мРНК вакцины BNT162b2 в недавнем исследовании [2]. Также следует отметить, что титры антител прямо коррелировали с их нейтрализующей активностью и через 6 месяцев нейтрализующая способность антител у вакцинированных «Спутником V» не отличалась от нейтрализующей способности антител, индуцированных мРНК вакцинами.

Заключение

В недавних эпидемиологических исследованиях было показано, что и «Спутник V» и «КовиВак» эффективно защищают от тяжелого течения болезни и поражения легких, вызванных различными вариантами вируса, включая вариант «Омикрон» [3], несмотря на различный профиль антительного иммунного ответа [1], что указывает на то, что несомненную защитную роль играет и Т-клеточный иммунный ответ, который эф-

фективно стимулируется как вакцинацией субъединичными, так и цельновирионными вакцинами [6].

Отдельно следует отметить, что повторная иммунизация как перенесших инфекцию COVID-19, так и вакцинированных различными вакцинами, вызывала сильный иммунный ответ, который в течение 6 месяцев сохранялся на более высоком уровне, чем до повторной иммунизации. При этом высокие титры антител обеспечивали более высокую нейтрализацию новых вариантов вируса.

Благодарности

Автор благодарит Г.А. Ефимова, А.В. Боголюбову-Кузнецову, А.А. Круглова, Д.А. Мазурова, Н.А. Круглову за предоставленные реактивы для исследования, М.С. Друцкую, А.В. Кривцова, М.А. Лагарькову, Д.В. Шевырева и В.П. Терещенко за помощь в сборе материала, В.Г. Круть, И.Н. Никонен, М.Ю. Боброва и А.Н. Шумеева за проведения экспериментов по нейтрализации и С.А. Недоспасова за общее руководство проектом.

Список литературы / References

1. Астраханцева И.В., Круть В.Г., Чувпило С.А., Шевырев Д.В., Шумеев А.Н., Рыбцов С.А., Недоспасов С.А. Об иммунологических исследованиях в Научно-технологическом университете «Сириус» // Молекулярная Биология. 2023. Т. 57, №2. С. 232-242. [Astrakhanseva I.V., Krut' V.G., Chuvpilo S.A., Shevryev D.V., Shumeev A.N., Rybtsov S.A., Nedospasov S.A. On Immunological Studies at Sirius University of Science and Technology. *Molekulyarnaya Biologiya = Molecular Biology*, 2023, Vol. 57, no. 2, pp. 225-234. (In Russ.)]
2. Augustyniak A., Szymański T., Porzucek F., Mieloch A.A., Semba J.A., Hubert K.A., Grajek D., Krela R., Rogalska Z., Zalc-Budziszewska E., Wysocki S., Sobczak K., Kuczyński L., Rybka J.D. A cohort study reveals different dynamics of SARS-CoV-2-specific antibody formation after Comirnaty and Vaxzevria vaccination. *Vaccine*, 2023, S0264-410X(23)00665-5. doi: 10.1016/j.vaccine.2023.06.008.
3. Barchuk A., Bulina A., Cherkashin M., Berezina N., Rakova T., Kuplevatskaya D., Skougarevskiy D., Okhotin A. Gam-COVID-Vac, EpiVacCorona, and CoviVac effectiveness against lung injury during Delta and Omicron variant surges in St. Petersburg, Russia: a test-negative case-control study. *Respir. Res.*, 2022, Vol. 23, no. 1, 276. doi: 10.1186/s12931-022-02206-3.
4. Du L., He Y., Zhou Y., Liu S., Zheng B.-J., Jiang S. The spike protein of SARS-CoV – a target for vaccine and therapeutic development. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2009, Vol. 7, no. 3, pp. 226-236.
5. Hartenian E., Nandakumar D., Lari A., Ly M., Tucker J.M., Glaunsinger B.A. The molecular virology of coronaviruses. *J. Biol. Chem.*, 2020, Vol. 295, no. 37, pp. 12910-12934.
6. Jacobsen H., Cobos Jiménez V., Sitaras I., Bar-Zeev N., Čičin-Šain L., Higdon M.M., Deloria-Knoll M. Post-vaccination T cell immunity to omicron. *Front. Immunol.*, 2022, Vol. 13, 944713. doi: 10.3389/fimmu.2022.944713.
7. Lu R., Zhao X., Li J., Niu P., Yang B., Wu H., Wang W., Song H., Huang B., Zhu N., Bi Y., Ma X., Zhan F., Wang L., Hu T., Zhou H., Hu Z., Zhou W., Zhao L., Chen J., Meng Y., Wang J., Lin Y., Yuan J., Xie Z., Ma Z., Liu W., Wang D., Xu W., Holmes E., Gao G., Wu G., Chen W., Shi W., Tan W. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *Lancet*, 2020, Vol. 395, no. 10224, pp. 565-574.
8. Rossi A.H., Ojeda D.S., Varese A., Sanchez L., Gonzalez Lopez L., Mazzitelli I., Alvarez Julia A., Oviedo Rouco S., Pallares H., Costa Navarro G., Rasetto N.B., Garsia C.I., Wenker S.D., Ramis L.Y., Bialer M.G., de Leone M.J., Hernando C.E., Sosa S., Bianchimano L., Rios A.S., Treffinger Cienfuego M., Caramelo J.J., Longueira Y., Laufer N., Alvarez D.E., Carradori J., Pedrozza D., Rima A., Echegoyen C., Ercole R., Gelpi P., Marchetti S., Zubieta M., Docena G., Kreplak N., Yanovsky M., Geffner J., Pifano M., Gamarnik A.V. Sputnik V vaccine elicits seroconversion and neutralizing capacity to SARS-CoV-2 after a single dose. *Cell Rep. Med.*, 2021, Vol. 2, no. 8, 100359. doi: 10.1016/j.xcrm.2021.100359.
9. Su S., Wong G., Shi W., Liu J., Lai A.C.K., Zhou J., Liu W., Bi Y., Gao G.F. Epidemiology, genetic recombination, and pathogenesis of coronaviruses. *Trends Microbiol.*, 2016, Vol. 24, no. 6, pp. 490-502.
10. Zhong N., Zheng B., Li Y., Poon L., Xie Z., Chan K., Li P., Tan S., Chang Q., Xie J., Liu X., Xu J., Li D., Yuen K., Peiris J., Guan Y. Epidemiology and cause of severe acute respiratory syndrome (SARS) in Guangdong, People's Republic of China, in February, 2003. *Lancet*, 2003, Vol. 362, no. 9393, pp. 1353-1358.

11. Zhong X., Yang H., Guo Z., Sin W., Chen W., Xu J., Fu L., Wu J., Mak C., Cheng C., Yang Y., Cao S., Wong T., Lai S., Xie Y., Cuo Z. B-Cell responses in patients who have recovered from severe acute respiratory syndrome target a dominant site in the S2 domain of the surface spike glycoprotein. *J. Virol.*, 2005, Vol. 79, no. 6, pp. 3401-3408.

12. Zhu M. SARS Immunity and vaccination. *Cell. Mol. Immunol.*, 2004, Vol. 1, no. 3, pp. 193-198.

Автор:

Астраханцева И.В. — к.б.н., старший научный сотрудник, направление «Иммунобиология и биомедицина», Научный центр генетики и наук о жизни АНО ВО «Университет “Сириус”», Краснодарский край, г. Сочи, Россия

Author:

Astrakhantseva I.V., PhD (Biology), Senior Research Associate, Department of Immunobiology and Biomedicine, Center of Genetics and Life Sciences, Sirius University, Sochi, Krasnodar Region, Russian Federation

*Поступила 10.07.2023
Принята к печати 12.07.2023*

*Received 10.07.2023
Accepted 12.07.2023*

ЭФФЕКТИВНОСТЬ КОМПЛЕКСНОГО ПОСЛЕ- ОПЕРАЦИОННОГО ЛЕЧЕНИЯ С ВКЛЮЧЕНИЕМ ТЕРАПИИ ИММУНОМОДУЛИРУЮЩИМ ГЕКСАПЕПТИДОМ У ДЕТЕЙ С ОСТРОЙ ДЕСТРУКТИВНОЙ ПНЕВМОНИЕЙ

Чапурина В.Н.¹, Нестерова И.В.^{1, 2}, Чудилова Г.А.¹, Ковалева С.В.¹,
Лягуша Д.Э.³, Тетерин Ю.В.¹, Барова Н.К.^{1, 3}, Тараканов В.А.¹

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

² ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы», Москва, Россия

³ ГБУЗ «Детская краевая клиническая больница» Министерства здравоохранения Краснодарского края,
г. Краснодар, Россия

Резюме. Острая деструктивная пневмония (ОДП) — тяжелая гнойно-септическая патология детского возраста, характеризующаяся высоким уровнем заболеваемости и сопряженная с дискордантной работой иммунной системы (ИС). В связи с чем очевидна необходимость изучения иммунопатогенеза данного заболевания для разработки новых терапевтических тактик, направленных на элиминацию возбудителя, дезинтоксикацию организма, купирование дыхательной недостаточности и коррекцию дефектов функционирования ИС. Цель: провести клинико-иммунологическое исследование эффективности иммуномодулирующей терапии с использованием фармпрепарата, действующей субстанцией которого является Гексапептид, включенного в комплексное послеоперационное лечение детей с острой деструктивной пневмонией. Проведено клинико-иммунологическое обследование 15 детей 2-5 лет с ОДП до начала (группа исследования 1 — ГИ1) и после (группа исследования 1а — ГИ1а) комплексного послеоперационного лечения с включением иммуномодулирующей терапии с использованием фармпрепарата на основе Гексапептида (ГП, Arginyl-alpha-Aspartyl-Lysyl-Valyl-Tyrosyl-Arginine), 20 условно здоровых детей (группа сравнения, ГС). Оценены содержание Т- и В-лимфоцитов, естественных киллерных клеток (ЕКК) (CYTOMICS FC500, США), уровни сывороточных IgA, IgM, IgG (ИФА), фагоцитарная и микробицидная активность нейтрофильных гранулоцитов (НГ). В ГИ1 до лечения выявлено снижение количества Т-лимфоцитов CD3⁺CD19⁻, T_{цТЛ}-лимфоцитов CD3⁺CD8⁺ на фоне значительного снижения содержания ЕКК CD3⁺CD16⁺CD56⁺ (p₁₋₃ < 0,05). Установлено, что при ОДП у иммунокомпрометированных детей уровень IgG не от-

Адрес для переписки:

Нестерова Ирина Вадимовна
ФГАОУ ВО «Российский университет
дружбы народов имени Патриса Лумумбы»
117513, Россия, Москва, Ленинский пр., 123, кв. 1.
Тел.: 8 (916) 187-73-41.
E-mail: inesterova1@yandex.ru

Address for correspondence:

Irina V. Nesterova
P. Lumumba Peoples' Friendship University
123 Leninsky Ave, Apt 1
Moscow
117513 Russian Federation
Phone: +7 (916) 187-73-41.
E-mail: inesterova1@yandex.ru

Образец цитирования:

В.Н. Чапурина, И.В. Нестерова, Г.А. Чудилова,
С.В. Ковалева, Д.Э. Лягуша, Ю.В. Тетерин,
Н.К. Барова, В.А. Тараканов «Эффективность
комплексного послеоперационного лечения с включением
терапии иммуномодулирующим гексапептидом у детей
с острой деструктивной пневмонией» // Российский
иммунологический журнал, 2023. Т. 26, № 4. С. 671-678.
doi: 10.46235/1028-7221-13954-EOC

© Чапурина В.Н. и соавт., 2023

Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

V.N. Chapurina, I.V. Nesterova, G.A. Chudilova,
S.V. Kovaleva, D.E. Lyagusha, Yu.V. Teterin, N.K. Barova,
V.A. Tarakanov "Efficiency of combined postoperative
treatment including an immunomodulatory hexapeptide
in children with acute destructive pneumonia", Russian Journal
of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskiy Zhurnal, 2023,
Vol. 26, no. 4, pp. 671-678.
doi: 10.46235/1028-7221-13954-EOC

© Chapurina V.N. et al., 2023

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

DOI: 10.46235/1028-7221-13954-EOC

личался от показателей ГС, при дефиците IgM ($p_{1,2} > 0,05$) и повышенном уровне IgA ($p < 0,05$). Установлены дефекты эффекторных функций НГ: недостаточность активно-фагоцитирующих НГ с нарушением захвата и киллинга бактериального антигена, NADPH-оксидазной активности – отсутствие ответа как на воспаление, так и на дополнительную индукцию *S. aureus*. После проведенного комплексного лечения с включением иммуномодулирующей терапии в группе ГИ1а наблюдалось восстановление содержания Т-лимфоцитов CD3⁺CD19⁻, T_{CTL}-лимфоцитов CD3⁺CD8⁺, ЕКК CD3⁻CD16⁺CD56⁺ ($p_{1-3} < 0,05$), отмечались тенденции к нормализации IgA, IgM, усиление эффекторных функций НГ – киллинговой способности за счет активации NADPH-оксидаз. Восстановление иммунологических показателей при ОДП оказывает позитивное влияние на более раннюю регрессию гнойно-деструктивного процесса в легких, отсутствие послеоперационных осложнений, в том числе профилактику септического процесса. Клинико-иммунологические эффекты программы иммуномодулирующей терапии с включением фармпрепарата на основе ГП определяют целесообразность ее использования в послеоперационном периоде у иммунокомпрометированных детей с ОДП.

Ключевые слова: острая деструктивная пневмония, иммунокомпрометированность, дети, иммуномодулирующая терапия, гексапептид, дефекты иммунной системы

EFFICIENCY OF COMBINED POSTOPERATIVE TREATMENT INCLUDING AN IMMUNOMODULATORY HEXAPEPTIDE IN CHILDREN WITH ACUTE DESTRUCTIVE PNEUMONIA

Chapurina V.N.^a, Nesterova I.V.^{a, b}, Chudilova G.A.^a, Kovaleva S.V.^a, Lyagusha D.E.^c, Teterin Yu.V.^a, Barova N.K.^{a, c}, Tarakanov V.A.^a

^a Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation

^b P. Lumumba Peoples' Friendship University, Moscow, Russian Federation

^c Children's Regional Clinical Hospital, Krasnodar, Russian Federation

Abstract. Acute destructive pneumonia (ADP) is a severe purulent and septic infectious disorder of childhood, characterized by a high level of morbidity and associated with imbalance of the immune system (IS). Hence, there is an obvious need to study the immunopathogenesis of this disease in order to develop new therapeutic strategy aimed at eliminating the pathogen, detoxifying the body, relieving respiratory failure and correcting functional immune deficiency. Our aim was to perform a clinical and immunological study in order to evaluate efficiency of immunomodulatory therapy using a medical drug with hexapeptide as an active substance. This drug was included into the complex postoperative treatment of children with acute destructive pneumonia. Clinical and immunological examination of 15 children 2-5 years old with ADP was performed before (study group 1 – SG1) and after (study group 1a – SG1a) combined postsurgical treatment including immunomodulatory therapy with a Hexapeptide-based pharmaceutical (HP, Arginyl-alpha-Aspartyl-Lysyl-Valyl-Tyrosyl-Arginine). Comparison group (CG) included twenty healthy children. The contents of T and B lymphocytes, natural killer cells (NK) were measured by means of flow cytometry (CYTOMICS FC 500, USA). Serum levels of IgA, IgM, IgG (ELISA), phagocytic and microbicidal activity of neutrophil granulocytes (NG) were also evaluated. Prior to the treatment in SG1 patients, a decreased number of CD3⁺CD19⁻T lymphocytes, CD3⁺CD8⁺ T_{CTL} lymphocytes was revealed along with significant decrease in the contents of CD3⁻CD16⁺CD56⁺ NK ($p_{1-3} < 0.05$). It was found that in children with ADP, the IgG level did not differ from indices of control group, with a decrease of IgM ($p_{1,2} > 0.05$), and increased level of IgA ($p < 0.05$). We have also found a deficiency of NG effector functions, i.e., insufficiency of active phagocytic NG with impaired capture and killing of bacterial antigen. Assays of NADPH-oxidase activity showed lacking response to both inflammation and additional induction by *S. aureus*. After complex treatment including immunomodulatory therapy in the SG1a group, we revealed a recovery in CD3⁺CD19⁻T lymphocyte contents, CD3⁺CD8⁺T_{CTL} lymphocytes, CD3⁻CD16⁺CD56⁺ NK ($p_{1-3} < 0.05$). The trends towards normalization of IgA, IgM, improved NG effector functions (killing ability) were revealed due to activation of NADPH-oxidases. The restoration of immunological parameters in ADP was associated with earlier recovery from the purulent-destructive process in lungs, absence of postoperative complications including the prevention of septic process. The clinical and immunological effects of the immunomodulatory therapy program with HP-based pharmaceutical preparations suggest its potential usage during postoperative period in immunocompromised children with ADP.

Keywords: pneumonia, acute destructive, immunocompromised, children, immunomodulatory therapy, hexapeptide, immune system, deficiency

Исследование выполнено в рамках государственного задания Министерства здравоохранения Российской Федерации № 121031000071-4.

Введение

Острая деструктивная пневмония (ОДП) на протяжении многих лет остается одним из самых тяжелых гнойно-септических заболеваний. Несмотря на доступность широкого спектра антибактериальной терапии и использование современных методов диагностики и хирургических технологий, распространенность ОДП не имеет направленности к снижению и даже возрастает [1, 9]. Из литературных источников известно, что ОДП наиболее часто регистрируются в детском возрасте до 5 лет (до 50%) и характеризуются увеличением количества септических осложнений, хронизацией гнойно-воспалительного процесса, возрастанием длительности лечения и числа летальных исходов [10]. Одним из ведущих факторов развития, тяжести течения и распространенности гнойно-септического процесса является иммунный статус ребенка [2, 11]. При ОДП в условиях существующих дефектов функционирования иммунной системы (ИС), воздействия оперативных вмешательств, стресса, агрессивного влияния антибактериальной терапии может возникнуть усугубление иммунопатологических состояний [2, 8].

Все это диктует необходимость разработки комплексного патогенетически обоснованного подхода к лечению, сочетающего хирургические и консервативные методы, направленные на полную элиминацию возбудителя, дезинтоксикацию организма, купирование дыхательных расстройств и коррекцию дефектов функционирования ИС.

Ранее нами было продемонстрировано позитивное иммуномодулирующее влияние фармпрепарата, действующей субстанцией которого является Гексапептид (ГП, Arginyl-alpha-Aspartyl-Lysyl-Valyl-Tyrosyl-Arginine), при дисфункциях нейтрофильных гранулоцитов (НГ) у детей с ОДП [7]. Непосредственный интерес представляет изучение эффектов влияния данного препарата при наличии у детей с ОДП приобретенного комбинированного иммунодефицита.

Фармпрепарат, действующей субстанцией которого является ГП, — аналог естественного гормона тимуса — тимопоэтина. Препарат обладает иммунорегуляторным действием, связываясь с различными рецепторами на клетках ИС и осуществляя запуск различных программ функционирования [12, 13], а также оказывает детоксикационные и гепатопротективные эффекты, обеспечивает инактивацию свободно-радикальных и перекисных соединений [3, 4]. Фармпрепарат, действующей субстанцией которого является ГП, разрешен к применению у детей с 2-летнего

возраста в лечении приобретенных иммунодефицитных состояний, что и явилось основанием для использования его в данном исследовании.

Цель — провести клинико-иммунологическое исследование эффективности иммуномодулирующей терапии с использованием фармпрепарата, действующей субстанцией которого является Гексапептид, включенного в комплексное послеоперационное лечение детей с острой деструктивной пневмонией.

Материалы и методы

Базой исследования явилась ГБУЗ «Детская краевая клиническая больница» МЗ Краснодарского края (г. Краснодар). Под наблюдением находилось 15 детей в возрасте 2-5 лет (8 девочек, 7 мальчиков) с диагнозом «острая деструктивная пневмония» (ОДП). Сформировано 2 группы исследования: группа исследования 1 (ГИ1, n = 15) — дети с ОДП, до начала лечения, группа исследования 1а (ГИ1а, n = 15) — дети с ОДП после окончания комплексного послеоперационного лечения с включением программы иммуномодулирующей терапии. В группу сравнения (ГС) вошли 20 условно здоровых детей сопоставимых по полу и возрасту.

У всех детей, вошедших в группы исследования, были выявлены критериальные признаки иммунокомпрометированности [5]. Установлено, что все пациенты не отвечали на стартовую антибактериальную терапию и была необходимость перехода на антибактериальные препараты из группы резерва (гликопептиды или оксазолидиноны).

Программа иммуномодулирующей терапии основана на использовании внутримышечных инъекций фармпрепарата, действующей субстанцией которого является ГП, 45 мкг/мл 1 мл через каждые 24 часа — 5 дней, далее через каждые 48 часов — 3 дня. Курсовая доза составила 360 мкг / 8 инъекций.

На проточном цитометре Cytomics FC-500 (Beckman Coulter, США) с использованием соответствующих МкАТ (Beckman Coulter, США) проведено иммунофенотипирование Т-лимфоцитов (CD3⁺CD19⁻, CD3⁺CD4⁺, CD3⁺CD8⁺, ИРИ) и В-лимфоцитов (CD3⁻CD19⁺), а также естественных киллерных клеток (ЕКК CD3⁻CD16⁺CD56⁺). Оценивали уровни сывороточных IgA, IgM, IgG (ИФА, тест-системы АО «Вектор-Бест», г. Новосибирск). «Фагоцитарную активность нейтрофильных гранулоцитов (НГ) определяли по показателям активно фагоцитирующих НГ (%ФАН), процессов захвата (ФЧ, ФИ) и степени завершенности фагоцитарного акта (%П, ИП). NADPH-оксидазную активность — по показателям NBT-теста спонтанного и стимулированного (*S. aureus*), учитывая % формазан-позитивных НГ (%ФПК), средний ци-

тохимический индекс (СЦИ), по соотношению %ФПКст/%ФПКсп рассчитывался коэффициент мобилизации (КМ)» [6].

Исследования одобрено этическим комитетом ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» МЗ России, в соответствии с требованиями Хельсинкской декларации с правками от 2013 года.

Для статистической обработки использовались Microsoft Excel 2016 и StatPlus 2010. В сравнении групп применялись непараметрические критерии: U-критерий Манна–Уитни, критерий Шапиро–Уилка и Вилкоксона. Результаты выражали в виде медианы (Me) и интерквартильного размаха ($Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$). Различия групп полагали статистически значимым при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Проведенное иммунологическое исследование детей группы ГИ1 продемонстрировало повышение уровня лейкоцитов до $13,2 (10,1-17,5) \times 10^9/\text{л}$, что в 2,3 раза больше показателей в ГС – $5,7 (5,4-6,0) \times 10^9/\text{л}$ ($p < 0,05$) на фоне возрастания относительного и абсолютного содержания НГ до $70,0 (61,8-74,0) \%$ и $9,8 (6,4-13,3) \times 10^9/\text{л}$ против $40,0 (32,2-42,0) \%$ и $2,7 (2,0-2,8) \times 10^9/\text{л}$ в ГС ($p_{1,2} < 0,05$) с наличием палочкоядерного сдвига влево $5,5 (4,0-8,0) \%$ и сниженным относительным количеством лимфоцитов (ЛФ) $21,5 (18,0-27,5) \%$ против $50,0 (43,3-57,6) \%$ в ГС ($p < 0,05$) (табл. 1).

При оценке клеточного иммунитета у детей с ОДП отмечалось снижение относительного количества Т-лимфоцитов $CD3^+CD19^-$ до $65,9 (56,7-67,0) \%$ против $70,4 (68,2-72,7) \%$ у детей ГС ($p < 0,05$) за счет уменьшения $T_{\text{цтл}}$ -лимфоцитов $CD3^+CD8^+$ $(20,4 (17,9-24,2) \%$ и $0,5 (0,4-0,6) \times 10^9/\text{л}$) относительно показателей условно здоровых детей $(27,9 (25,9-30,4) \%$ и $0,7 (0,6-0,8) \times 10^9/\text{л}$) на фоне преобладания В-лимфоцитов $CD3^-CD19^+$ $24,0 (19,8-33,3) \%$ против $17,2 (14,2-19,0) \%$ в группе условно здоровых детей ($p < 0,05$). При этом в ГИ1 установлен значительный дефицит ЕКК $CD3^-CD16^+CD56^+$ $4,2 (2,6-5,4) \%$ и $0,12 (0,07-0,19) \times 10^9/\text{л}$ против $10,3 (8,9-15,5) \%$ и $0,3 (0,27-0,41) \times 10^9/\text{л}$ в ГС ($p_{1,2} < 0,05$) (табл. 1).

При анализе гуморального звена у детей с ОДП выявлен низкий ответ на тяжелый гнойно-септический процесс: IgM снижен в 1,5 раза относительно показателей условно здоровых детей $(0,9 (0,6-1,4) \text{ г/л}$ против $1,4 (1,3-1,5) \text{ г/л}$, $p < 0,05$), отсутствовал прирост IgG ($p > 0,05$) на фоне возрастания IgA $2,22 (1,5-2,5) \text{ г/л}$ относительно $1,3 (1,1-1,4) \text{ г/л}$ в ГС ($p < 0,05$) (табл. 1).

При оценке функциональной активности НГ выявлен неадекватный ответ со стороны активно-фагоцитирующих НГ относительно ГС ($p > 0,05$), ассоциированный с дефектностью процессов захвата бактериального антигена ($p < 0,05$, $p > 0,05$) и киллинговой активности ($p_{1,2} < 0,05$) на фоне

низкой продукции кислородных радикалов в спонтанном и стимулированном NBT-тесте, но с сохранением резервного потенциала (табл. 2).

При оценке иммунологического статуса пациентов после курса комплексного послеоперационного лечения с включением иммуномодулирующей терапии препаратом на основе ГП выявлено снижение в 1,7 раз количества лейкоцитов до $7,8 (4,8-8,4) \times 10^9/\text{л}$, так и не достигающее значений условно здоровых детей ($p < 0,05$), на фоне нормализации абсолютных и относительных значений ЛФ и НГ (табл. 1).

Клеточный иммунитет после курса комплексного послеоперационного лечения характеризовался восстановлением количества Т-лимфоцитов $CD3^+CD19^-$ за счет увеличения $T_{\text{цтл}}$ -лимфоцитов $CD3^+CD8^+$ на фоне тенденции к снижению В-лимфоцитов $CD3^-CD19^+$ относительно значений до лечения ($p_{1,2} < 0,05$, $p > 0,05$). Также отмечался прирост относительного и абсолютного количества ЕКК до показателей ГС ($p_{1,2} < 0,05$). Показатели гуморального звена иммунной системы – сывороточные IgA, IgM имели тенденцию к восстановлению ($p_{1,2} > 0,05$) (табл. 1).

Оценка эффекторных функций НГ продемонстрировала нивелирование ранее выявленных дефектов: усиление процессов захвата и переваривания бактериального антигена с сохранением количества активно-фагоцитирующих НГ на фоне усиления активации стимулированной микробицидной оксидазой активности ($p_{1,2} < 0,05$) с сохранением микробицидного потенциала ($p > 0,05$) относительно показателей ГИ1 (табл. 2).

Позитивные иммунологические эффекты влияния комплексного послеоперационного лечения с включением иммуномодулирующей терапии с использованием фармпрепарата, действующей субстанции которого является ГП, сочетались с положительной клинической динамикой. Так, наблюдалась регрессия воспалительного процесса в виде улучшения сатурации с дальнейшим уменьшением уровня дыхательной недостаточности, исчезновения инфильтрации и деструкции легочной ткани, санации респираторного тракта с улучшением эвакуации мокроты, раннего купирования интоксикационного синдрома и отсутствия послеоперационных осложнений. Важно отметить, что своевременная коррекция комбинированных дефектов ИС у иммунокомпрометированных детей с ОДП приводит к оптимизации антибактериальной терапии – снижению курсов антибактериальной терапии и необходимости использования антибактериальных препаратов из группы резерва, что уменьшает их негативное влияние на мукозальный и системный иммунитет и микробиом всех слизистых оболочек, а также способствует сокращению сроков послеоперационной реабилитации.

ТАБЛИЦА 1. ПОКАЗАТЕЛИ ИММУННОГО СТАТУСА ИММУНОКОМПРОМЕТИРОВАННЫХ ДЕТЕЙ 2-5 ЛЕТ С ОДП НА ФОНЕ КОМПЛЕКСНОГО ПОСЛЕОПЕРАЦИОННОГО ЛЕЧЕНИЯ С ВКЛЮЧЕНИЕМ ИМУНОМОДУЛИРУЮЩЕЙ ТЕРАПИИ, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 1. INDICATORS OF THE IMMUNE STATUS OF IMMUNOCOMPROMISED CHILDREN AGED 2-5 YEARS WITH ADP ON THE BACKGROUND OF COMPLEX POSTOPERATIVE TREATMENT WITH THE INCLUSION OF IMMUNOMODULATORY THERAPY, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

Показатели Indicators	Группа сравнения Comparison group	Группа исследования до лечения (ГИ1) Study group before treatment (SG1)	Группа исследования после лечения (ГИ1а) Study group after treatment (SG1a)
WBC, 10 ⁹ /л / WBC, 10 ⁹ /L	5,7 (5,4-6,0)	13,2* (10,0-17,5)	7,8* ^ (4,8-8,5)
ЛФ, % / LY, %	50,0 (43,3-57,6)	21,5* (18,0-27,5)	55,0^ (46,0-56,0)
ЛФ, 10 ⁹ /л / LY, 10 ⁹ /L	3,0 (2,4-3,2)	2,8 (2,3-4,1)	3,3 (2,3-4,3)
НГ, % / NG, %	40,0 (32,2-42,0)	70,0* (61,8-74,0)	40,0^ (37,3-40,8)
НГ, 10 ⁹ /л / NG, 10 ⁹ /L	2,7 (2,0-2,8)	9,8* (6,4-13,3)	3,1^ (2,6-3,9)
Т-лимфоциты T lymphocytes CD3 ⁺ CD19 ⁻ , %	70,4 (68,2-72,7)	65,9* (56,7-67,0)	73,8^ (69,7-75,6)
Т-лимфоциты CD3 ⁺ CD19 ⁻ , 10 ⁹ /л T lymphocytes CD3 ⁺ CD19 ⁻ , 10 ⁹ /L	1,9 (1,5-2,2)	1,8 (1,4-2,1)	2,6 (1,5-3,1)
Т-хелперы / T helpers CD3 ⁺ CD4 ⁺ , %	41,1 (39,4-42,7)	39,8 (31,1-44,3)	41,8 (36,6-47,5)
Т-хелперы CD3 ⁺ CD4 ⁺ , 10 ⁹ /л T helpers CD3 ⁺ CD4 ⁺ , 10 ⁹ /L	1,3 (0,9-1,4)	1,1 (0,8-1,3)	1,2 (1,0-1,8)
ЦТЛ / CTL CD3 ⁺ CD8 ⁺ , %	27,8 (25,9-30,4)	20,4* (17,9-24,2)	25,6^ (24,8-26,3)
ЦТЛ CD3 ⁺ CD8 ⁺ , 10 ⁹ /л CTL CD3 ⁺ CD8 ⁺ , 10 ⁹ /L	0,7 (0,6-0,8)	0,5* (0,4-0,6)	0,8 (0,6-1,0)
ИРИ / IRI CD4/CD8	1,4 (1,3-1,7)	1,9 (1,5-2,5)	1,7 (1,3-2,1)
ЕКК, % NK, % CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺	10,3 (8,9-15,5)	4,2* (2,6-5,4)	8,7^ (7,4-9,9)
ЕКК, 10 ⁹ /л NK, 10 ⁹ /L CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺	0,3 (0,27-0,41)	0,12* (0,07-0,19)	0,23^ (0,22-0,30)
В-лимфоциты B lymphocytes CD3 ⁺ CD19 ⁺ , %	17,2 (14,2-19,0)	24,0* (19,8-33,3)	15,6 (12,9-17,4)
В-лимфоциты CD3 ⁺ CD19 ⁺ , 10 ⁹ /л B lymphocytes CD3 ⁺ CD19 ⁺ , 10 ⁹ /L	0,5 (0,3-0,6)	0,8 (0,6-0,9)	0,5 (0,3-0,8)
IgA г/л / IgA g/L	1,3 (1,1-1,4)	2,2* (1,5-2,5)	1,8 (1,7-2,0)
IgM г/л / IgM g/L	1,4 (1,3-1,5)	0,9 (0,6-1,4)	1,3 (1,3-1,4)
IgG г/л / IgG g/L	12,1 (11,00-13,89)	14,5 (13,1-18,3)	13,9 (12,6-15,0)

Примечание. * – отличия показателей исследуемых групп с острой деструктивной пневмонией от показателей условно здоровых детей, p < 0,05; ^ – различия между группами исследования, p < 0,05.

Note. *, differences in the indicators of the studied groups with acute destructive pneumonia from those of conditionally healthy children, p < 0,05; ^, differences between study groups, p < 0,05.

ТАБЛИЦА 2. ПОКАЗАТЕЛИ ФАГОЦИТАРНОЙ И НАДРН-ОКСИДАЗНОЙ МИКРОБИЦИДНОЙ АКТИВНОСТИ ИММУНОКОМПРОМЕТИРОВАННЫХ ДЕТЕЙ 2-5 ЛЕТ С ОДП НА ФОНЕ КОМПЛЕКСНОГО ПОСЛЕОПЕРАЦИОННОГО ЛЕЧЕНИЯ С ВКЛЮЧЕНИЕМ ИМУНОМОДУЛИРУЮЩЕЙ ТЕРАПИИ, Ме (Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 2. INDICATORS OF PHAGOCYtic AND NADPH-OXIDASE MICROBICIDAL ACTIVITY OF IMMUNOCOMPROMISED CHILDREN AGED 2-5 YEARS WITH ADP ON THE BACKGROUND OF COMPLEX POSTOPERATIVE TREATMENT WITH THE INCLUSION OF IMMUNOMODULATORY THERAPY, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

Показатели Indicators	Группа сравнения Comparison group	Группа исследования до лечения (ГИ1) Study group before treatment (SG1)	Группа исследования после лечения (ГИ1а) Study group after treatment (SG1a)
%ФАН %PhAN	55,4 (54,2-57,9)	56,0 (46,2-61,7)	64,0 (59,0-72,0)*
ФЧ PhN	4,1 (3,9-5,0)	3,3 (2,7-3,8)*	3,6 (3,4-3,7)
ФИ PhI	2,5 (1,7-3,4)	1,9 (1,4-2,1)	2,3 (2,0-2,7)
%П %D	61,9 (57,6-62,4)	42,8 (37,5-48,1)* ^	55,0 (50,6-55,9)*
ИП DI	1,6 (1,2-1,8)	0,8 (0,6-1,0)*	1,0 (0,8-1,4)
NBT-тест NBT test			
%ФПК спонтанный %FPC spontaneous	3,5 (3,0-4,0)	2,0 (1,0-2,5)*	2,0 (1,0-3,8)
СЦИ спонтанный SCI spontaneous	0,07 (0,02-0,09)	0,04 (0,03-0,11)	0,08 (0,40-0,12)
%ФПК стимулированный %FPC stimulated	4,5 (4,0-7,0)	4,0 (1,3-6,0)	7,9 (6,3-10,9)^
СЦИ стимулированный SCI stimulated	0,19 (0,15-0,29)	0,16 (0,08-0,32)	0,35 (0,34-0,39)* ^
КМ MC	2,1 (2,0-3,5)	4,0 (1,0-4,8)	4,4 (3,8-5,5)

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. As for Table 1.

Заключение

Проведенное исследование позволило выявить у детей с ОДП 2-5 лет комбинированные дефекты ИС в виде нарушений Т-клеточного иммунитета, ЕКК, гуморального звена и эффекторных функций НГ. Дефектное функционирование и неадекватный ответ ИС на гнойно-септический процесс свидетельствуют об иммунокомпрометированности пациентов с ОДП. Полученные результаты исследования определяют рациональность и иммунопотенгирующую обоснованность использования в комплексном послеоперационном лечении разработанной программы иммуномодулирующей терапии с включением фармпрепарата, действующей субстанцией которого является ГП, у иммунокомпрометированных детей 2-5 лет с ОДП. Выявленные позитивные

иммунологические эффекты влияния иммуномодулирующей терапии способствуют, прежде всего, устранению дисрегуляции основных противoinфекционных механизмов адаптивного и врожденного иммунитета при ОДП. Возможность проведения своевременной иммуномодулирующей терапии, включенной в комплексную программу послеоперационного лечения на фоне адекватной антибактериальной терапии, позитивно сказалась на характере и исходе заболевания с разрешением гнойно-деструктивного процесса в легких, отсутствием послеоперационных осложнений, уменьшением риска усугубления выявленных комбинированных нарушений ИС и профилактикой септических осложнений, что оптимизирует лечение и сокращает сроки послеоперационной реабилитации.

Список литературы / References

1. Вечеркин В.А., Тома Д.А., Птицын В.А., Коряшкин П.В. Деструктивные пневмонии у детей // Российский вестник детской хирургии, анестезиологии и реаниматологии, 2019. Т. 9, № 3. С. 108-115. [Vecherkin V.A., Toma D.A., Ptitsyn V.A., Koryashkin P.V. Destructive pneumonias in children. *Rossiyskiy vestnik detskoy khirurgii, anesteziologii i reanimatologii = Russian Journal of Pediatric Surgery, Anesthesia and Intensive Care*, 2019, Vol. 9, no. 3, pp. 108-115. (In Russ.)]
2. Киселевский М.В., Ситдикова С.М., Абдуллаев А.Г., Шляпников С.А., Чикилева И.О. Иммуносупрессия при сепсисе и возможности ее коррекции // Вестник хирургии имени И.И. Грекова, 2018. Т. 177, № 5. С. 105-107. [Kiselevskii M.V., Sitdikova S.M., Abdullaev A.G., Shlyapnikov S.A., Chikileva I.O. Immunosuppression in sepsis and the possibilities of its correction. *Vestnik khirurgii imeni I.I. Grekova = I. Grekov Bulletin of Surgery*, 2018, Vol. 177, no. 5, pp. 105-107. (In Russ.)]
3. Кологривова Е.Н., Плешко Р.И., Щербик Н.В., Староха А.В., Чичинкас Э. Влияние интраназального применения Имунофана на активность фагоцитов при комплексной терапии экссудативного среднего отита у детей // Медицинская иммунология, 2020. Т. 22, № 4. С. 741-750. [Kologrivova E.N., Pleshko R.I., Scherbik N.V., Starokha A.V., Chichinskas E. Effects of intranasal Imunofan administration upon phagocytic activity in treatment of exudative otitis media in children. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2020, Vol. 22, no. 4, pp. 741-750. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-EOI-1720.
4. Маркова Т.П., Чувилов Д.Г. Имунофан в комплексном лечении детей с повторными респираторными заболеваниями и микоплазменной инфекцией // Эффективная фармакотерапия, 2022. Т. 18, № 12. С. 12-18. [Markova T.P., Chuvirov D.G. Immunotherapy with Imunofan to the Treatment of Children with Recurrent Respiratory Disease and Mycoplasma Pneumoniae Infection. *Effektivnaya farmakoterapiya = Effective Pharmacotherapy*, 2022, Vol. 18, no. 12, pp. 12-18. (In Russ.)]
5. Нестерова И.В. Глава 4. Вторичные иммунодефициты и методы их коррекции // Иммуноterapia в практике ЛОР-врача и терапевта / Под ред. А.С. Симбирцева, Г.В. Лавреновой. СПб.: Диалог, 2022. С. 116-177. [Nesterova I.V. Chapter 4. Secondary immunodeficiency and methods of their correction. *Immunotherapy in the practice of ENT doctor and therapist*. Ed. Simbirtsev A.S., Lavrenova G.V.] St. Petersburg: Dialog, 2022, pp. 116-177.
6. Нестерова И.В., Чудилова Г.А., Ковалева С.В., Ломтатидзе Л.В., Колесникова Н.В., Евлевский А.А. Методы комплексной оценки функциональной активности нейтрофильных гранулоцитов в норме и патологии. Методические рекомендации. Краснодар, 2017. 52 с. [Nesterova I.V., Chudilova G.A., Kovaleva S.V., Lomtadidze L.V., Kolesnikova N.V., Yevlevsky A.A. Methods for comprehensive assessment of the functional activity of neutrophil granulocytes in health and disease (guidelines). Krasnodar, 2017. 52 p.
7. Нестерова И.В., Чудилова Г.А., Чапурина В.Н., Ковалева С.В., Ломтатидзе Л.В., Тетерин Ю.В., Барова Н.К., Тараканов В.А. Таргетная иммунокоррекция двух негативно трансформированных субпопуляций нейтрофильных гранулоцитов при острой деструктивной пневмонии у детей раннего возраста // Эффективная фармакотерапия, 2022. Т. 18, № 12. С. 36-43. [Nesterova I.V., Chudilova G.A., Chapurina V.N., Kovaleva S.V., Lomtadidze L.V., Teterin YU.V., Barova N.K., Tarakanov V.A. The target immunocorrection of two negatively transformed subsets of neutrophilic granulocytes of young children with acute destructive pneumonia. *Effektivnaya farmakoterapiya = Effective Pharmacotherapy*, 2022, Vol. 18 (12), pp. 36-43. (In Russ.)]
8. Оптимизация диагностики и лечения гнойно-воспалительных заболеваний (Инновационные технологии): Практическое руководство / Под ред. Ревшвили А.Ш., Земскова В.М., Земскова А.М. СПб.: СпецЛит, 2020. 319 с. [Optimization of diagnostics and treatment of purulent-inflammatory diseases (innovative technologies). Ed. Revishvili A.Sh., Zemskov V.M., Zemskov A.M.] St. Petersburg: SpetsLit, 2020. 319 p.
9. Раупов Ф.С., Рашидова М.А. Острая бактериальная деструктивная пневмония у детей // Research Journal of Trauma and Disability Studies, 2023. Т. 2, № 5. С. 219-224. [Raupov F.S., Rashidova M. A. Acute bacterial destructive pneumonia in children. *Research Journal of Trauma and Disability Studies = Research Journal of Trauma and Disability Studies*, 2023, Vol. 2, no. 5, pp. 219-224. (In Russ.)]
10. Тараканов В.А., Барова Н.К., Шумливая Т.П., Голосеев К.Ф., Киселев А.Н., Колесников Е.Г., Горьковой И.С., Убилова И.А., Кулиш Т.А. Современные технологии в диагностике и лечении острой бактериально-деструктивной пневмонии у детей // Российский вестник детской хирургии, анестезиологии и реаниматологии, 2015. Т. 5, № 1. С. 50-56. [Tarakanov V.A., Barova N.K., Shumlivaya T.P., Goloseev K.F., Kiselev A.N., Kolesnikov E.G., Gorkovoy I.S., Ubilava I.A., Kulish T.A. Modern technology in the diagnosis and treatment of acute bacterial necrotizing pneumonia in children. *Rossiyskiy vestnik detskoy khirurgii, anesteziologii i reanimatologii = Russian Journal of Pediatric Surgery, Anesthesia and Intensive Care*, 2015, Vol. 5, no. 1, pp. 50-56. (In Russ.)]
11. Татаурщикова Н.С. Особенности аллергического воспаления в оценке фенотипов аллергического ринита // Фарматека, 2018. № S1. С. 12-15. [Tataurshchikova N.S. Features of allergic inflammation in assessment of phenotypes of allergic rhinitis. *Farmateka = Pharmateca*, 2018, no. S1, pp. 12-15. (In Russ.)]
12. Liu Z., Zheng X., Wang J., Wang E. Molecular analysis of thymopentin binding to HLA-DR molecules. *PLoS One*, 2007, Vol. 2, no. 12, e1348. doi: 10.1371/journal.pone.0001348.
13. Wei X., Zhang L., Zhang R., Wu R., Petite J.N., Hou Y., Si D., Ahmad B., Guo H., Zhang M., Cheng Q., Tong Y. Targeting the TLR2 receptor with a novel thymopentin-derived peptide modulates immune responses. *Front. Immunol.*, 2021, Vol. 12, 620494. doi: 10.3389/fimmu.2021.620494

Авторы:

Чапурина В.Н. — ассистент кафедры клинической иммунологии, аллергологии и лабораторной диагностики ФПК и ППС ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Краснодар, Россия

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

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

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

Лягуша Д.Э. — врач-педиатр хирургического отделения № 1 ГБУЗ «Детская краевая клиническая больница» Министерства здравоохранения Краснодарского края, г. Краснодар, Россия

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

Барова Н.К. — к.м.н., доцент, заведующая кафедрой хирургических болезней детского возраста ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ; заведующая хирургическим отделением № 1 ГБУЗ «Детская краевая клиническая больница» Министерства здравоохранения Краснодарского края, г. Краснодар, Россия

Тараканов В.А. — д.м.н., профессор кафедры хирургических болезней детского возраста ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Краснодар, Россия

Authors:

Chapurina V.N., Assistant Professor, Department of Clinical Immunology, Allergology and Laboratory Diagnostics, Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation

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

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

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

Lyagusha D.E., Pediatrician, Surgical Department No. 1, Children's Regional Clinical Hospital, Krasnodar, Russian Federation

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

Barova N.K., PhD (Medicine), Associate Professor, Head, Department of Surgical Diseases of Childhood, Kuban State Medical University; Head, Surgical Department No. 1, Children's Regional Clinical Hospital, Krasnodar, Russian Federation

Tarakanov V.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Surgical Diseases of Childhood, Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation

КЛИНИКО-ИММУНОЛОГИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИММУНОМОДУЛИРУЮЩЕГО ГЕКСАПЕПТИДА АРГИНИЛ-АЛЬФА-АСПАРТИЛ- ЛИЗИЛ-ВАЛИЛ-ТИРОЗИЛ-АРГИНИН В КОМПЛЕКСНОМ ПОСЛЕОПЕРАЦИОННОМ ЛЕЧЕНИИ ДЕТЕЙ С ОСТРЫМ ОСТЕОМИЕЛИТОМ

Чудилова Г.А.¹, Чичерев Е.А.¹, Тетерин Ю.В.¹, Чапурина В.Н.¹,
Тараканов В.А.¹, Барова Н.К.¹, Нестерова И.В.^{1, 2}

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

² ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы», Москва, Россия

Резюме. Рецидивирующий и устойчивый характер остеомиелита, а также связанная с ним высокая заболеваемость пациентов, длительная госпитализация и дорогостоящее лечение диктуют необходимость разработки новых подходов в терапии, патогенетически обосновывающих использование иммуностропных препаратов в комплексном этиопатогенетическом лечении данной патологии. Цель исследования — оценить клинико-иммунологическую эффективность включения гексапептида — аргинил-альфа-аспартил-лизил-валил-тирозил-аргинин в комплексное лечение острого остеомиелита у детей в послеоперационном периоде. Исследовано 19 детей 8-15 лет с острым остеомиелитом (ОМ), группа исследования 1 (ГИ1, n = 11) получала на всех этапах стандартную схему лечения; в группе исследования 2 (ГИ2, n = 8) стандартная терапия была дополнена назначением фармпрепарата Имунофан, активной субстанцией которого является гексапептид (ГП). До и после проведенного лечения определяли: содержание Т-лимфоцитов (CD3⁺CD19⁻, CD3⁺CD4⁺, CD3⁺CD8⁺, CD3⁺CD4⁺/CD3⁺CD8⁺) и В-лимфоцитов (CD3⁻CD19⁺), NK- (CD3⁻CD16⁺CD56⁺) Cytomics FC-500 (Beckman Coulter, США), уровень сывороточных IgA, IgM, IgG (ИФА), оценку фагоцитарной активности нейтрофильных гранулоцитов (НГ) с определением доли активно фагоцитирующих НГ (%ФАН) процессов захвата (ФЧ, ФИ) и степени завершенности фагоцитарного акта (%П, ИП) по отношению к *S. aureus* (штамм № 209). В исследуемых группах с ОМ выявлено снижение содержания Т-лимфоцитов, Т-хелперов, T_{цтл}-лимфоцитов, NK-клеток на фоне неменяющегося содержания В-лимфоцитов. В ГИ2 показано повышение уровня IgA и IgG. Установ-

Адрес для переписки:

Чудилова Галина Анатольевна
ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ
350063, Россия, г. Краснодар, ул. Митрофана Седина, 4.
Тел.: 8 (918) 410-22-14.
E-mail: chudilova2015@yandex.ru

Address for correspondence:

Galina A. Chudilova
Kuban State Medical University
4 Mitrofan Sedin St
Krasnodar
350063 Russian Federation.
Phone: +7 (918) 410-22-14.
E-mail: chudilova2015@yandex.ru

Образец цитирования:

Г.А. Чудилова, Е.А. Чичерев, Ю.В. Тетерин, В.Н. Чапурина, В.А. Тараканов, Н.К. Барова, И.В. Нестерова «Клинико-иммунологическая эффективность иммуномодулирующего гексапептида аргинил-альфа-аспартил-лизил-валил-тирозил-аргинина в комплексном послеоперационном лечении детей с острым остеомиелитом» // Российский иммунологический журнал, 2023. Т. 26, № 4. С. 679-688. doi: 10.46235/1028-7221-13763-CAI

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

For citation:

G.A. Chudilova, E.A. Chicherev, Yu.V. Teterin, V.N. Chapurina, V.A. Tarakanov, N.K. Barova, I.V. Nesterova "Clinical and immunological efficacy of the immunomodulating hexapeptide arginyl-alpha-aspartyl-lysyl-valyl-tyrosyl-arginine in the complex postoperative treatment of children with acute osteomyelitis", Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2023, Vol. 26, no. 4, pp. 679-688. doi: 10.46235/1028-7221-13763-CAI

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

DOI: 10.46235/1028-7221-13763-CAI

лены дефекты фагоцитарной функции, связанные с процессами завершения фагоцитарного акта. Применение иммуномодулирующей терапии фарм. препаратом, активной субстанцией которого является ГП, в комплексе со стандартным лечением сопровождалось восстановлением иммунологических показателей до соответствующих значений условно здоровых детей, что привело к уменьшению длительности лихорадочного периода, проявлений интоксикации, более ранним срокам купирования гнойно-воспалительного процесса и сокращению количества дней пребывания в стационаре. Полученные позитивные клинико-иммунологические эффекты демонстрируют целесообразность использования иммуномодулирующей таргетной терапии с включением фарм. препарата, активной субстанцией которого является ГП, в комплексное послеоперационное лечение детей с ООМ. Восстановление нарушенных механизмов противоинфекционного иммунитета при ООМ при использовании иммуномодулирующего ГП способствует более эффективной элиминации патогенов и, как следствие, улучшению клинического течения заболевания, а также препятствует хронизации воспалительного процесса и усугублению дисфункции иммунной системы.

Ключевые слова: острый остеомиелит, дети, дисфункции иммунной системы, иммуномодулирующая терапия, гексапептид, клинико-иммунологическая эффективность

CLINICAL AND IMMUNOLOGICAL EFFICACY OF THE IMMUNOMODULATING HEXAPEPTIDE ARGINYL-ALPHA-ASPARTYL-LYSYL-VALYL-TYROSYL-ARGININE IN THE COMPLEX POSTOPERATIVE TREATMENT OF CHILDREN WITH ACUTE OSTEOMYELITIS

Chudilova G.A.^a, Chicherev E.A.^a, Teterin Yu.V.^a, Chapurina V.N.^a, Tarakanov V.A.^a, Barova N.K.^a, Nesterova I.V.^{a, b}

^a Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation

^b P. Lumumba Peoples' Friendship University, Moscow, Russian Federation

Abstract. The recurrent and persistent nature of osteomyelitis, like as associated high morbidity of patients, prolonged hospitalization and expensive treatment require development of new approaches in therapy and pathogenetic justification of the immunotropic drugs usage in complex etiopathogenetic treatment of this disorder. Our objective was to evaluate the clinical and immunological efficacy of hexapeptide (HP), arginyl-alpha-aspartyl-lysyl-valyl-tyrosyl-arginine implemented in the complex treatment of acute osteomyelitis in children during the postoperative period. 19 children aged 8-15 years with acute osteomyelitis (AOM) were studied: the study group 1 (SG1, n = 11) received a standard treatment at all the disease stages; in study group 2 (SG2, n = 8), the standard therapy was supplemented with a medical drug Imunofan, containing hexapeptide (HP) as the active substance. Prior and after the course of drug treatment, we determined the following parameters: the contents of T cells (CD3⁺CD19⁻, CD3⁺CD4⁺, CD3⁺CD8⁺, CD3⁺CD4⁺/CD3⁺CD8⁺) and B cells (CD3⁻CD19⁺), NK (CD3⁻CD16⁺CD56⁺) by means of Cytomics FC-500 ("Beckman Coulter", USA), the levels of serum IgA, IgM, IgG (ELISA tests), assessment of phagocytic activity of neutrophil granulocytes (NG) with determining the ratio of actively phagocytic NG (%PhAN), capture processes (PhN, PhI) and the completeness of phagocytosis (%D, DI) tested with *S. aureus* (strain No. 209). In the studied groups with AOM, a decreased content of T lymphocytes, T helper cells, T lymphocytes, NK cells was revealed, along with unchanged content of B lymphocytes. In SG2, the increased IgA and IgG levels have been shown. We have also revealed a deficiency of phagocytic function associated with the processes of phagocytosis completion. The use of immunomodulatory therapy with an HP-containing pharmaceutical drug in combination with standard treatment was associated with restoration of immunological parameters to the reference values of healthy children, thus leading to shorter febrile period, milder manifestations of intoxication, earlier periods of convalescence from purulent-inflammatory process, and reduced hospital stay. The obtained positive clinical and immunological effects demonstrate the expediency of targeted immunomodulatory therapy including a

pharmaceutical HP-containing drug as the active substance in the complex postoperative treatment of children with AOM. Restoration of the disturbed mechanisms of anti-infectious immunity in AOM under usage of immunomodulating HP contributes to more effective elimination of pathogens and, as a result, improvement of the clinical course of the disease, as well as prevention of chronic inflammatory processes and aggravation of immune system dysfunction.

Keywords: acute osteomyelitis, children, immune system dysfunction, immunomodulatory therapy, hexapeptide, clinical and immunological efficacy

Исследование выполнено в рамках государственного задания Министерства здравоохранения Российской Федерации № 121031000071-4.

Введение

Остеомиелит (ОМ) — инфекционное воспаление кости и костного мозга, является одним из самых тяжелых гнойно-воспалительных заболеваний, приводящих к полиорганной недостаточности, сепсису, инвалидизации пациентов [2, 14]. Среди всех хирургических заболеваний у детей ОМ отводится около 2,2-11%. Летальность при ОМ встречается при токсических и тяжелых септико-пиемических формах заболевания, что составляет от 2,7 до 18,3% [3, 12]. ОМ стал еще более проблематичным с появлением высоковирулентных штаммов *S. aureus* (метициллин-резистентный золотистый стафилококк) с множественной лекарственной устойчивостью к антибиотикам [15].

S. aureus разработал многочисленные стратегии для эффективного уклонения от адаптивной защиты хозяина, которая состоит из клеточно-опосредованных ответов с преобладанием Т-клетки и гуморальных ответов антител, опосредованных В-клетками. Антитела к *S. aureus* выявляются у всех людей из-за контакта в результате предшествующих инфекций или бессимптомного носительства, но их присутствие не гарантирует защиту от будущих инфекций [11]. Негативное влияние самого *S. aureus*, нарушение его элиминации, ассоциированное с дисфункциями иммунной системы (ИС), являются условиями распространения инфекционного процесса в кости [9, 10, 13]. Это подтверждается данными о наличии иммунной недостаточности до начала заболевания, ставшей причиной возникновения и прогрессирования очага воспаления в костной ткани при хроническом ОМ [1, 4, 5]. Дисбаланс ИС при ОМ: высокий уровень содержания IgM наряду со снижением клеточного звена иммунитета, повышенные уровни провоспалительных цитокинов, был установлен в различных исследованиях [1, 3, 5, 13]. Ранее нами были выявлены комбинированные дефекты функционирования ИС при остром гематогенном и остром посттравматическом остеомиелитах у детей [8], что диктует необходимость разработки новых под-

ходов в терапии, патогенетически обосновывающих использование иммуотропных препаратов в комплексном этиопатогенетическом лечении данной патологии. В связи с этим является перспективным использование иммунорегуляторного гексапептида — аргинил-альфа-аспартил-лизил-валил-тирозил-аргинин (ГП), который различными механизмами влияет на иммунокомпетентные клетки, восстанавливает баланс окислительно-антиокислительных реакций, способен усиливать эффективность антибактериальной терапии, ингибировать множественную лекарственную устойчивость организма [6].

Цель исследования — оценить клинико-иммунологическую эффективность включения гексапептида — аргинил-альфа-аспартил-лизил-валил-тирозил-аргинин в комплексное лечение острого остеомиелита у детей в послеоперационном периоде.

Материалы и методы

В исследование были включены 19 детей в возрасте 8-15 лет с острым остеомиелитом (ОМ), госпитализированных в ГБУЗ «Детская краевая клиническая больница» МЗ Краснодарского края в период с 2021 по 2023 г.

Распределение пациентов по группам исследования было обосновано различием схем проводимого в послеоперационном периоде медикаментозного лечения.

Были сформированы 2 группы исследования: группа исследования 1 включала 11 детей (1 девочка, 10 мальчиков), получавших на всех этапах стандартную схему лечения; группа исследования 2 включала 8 детей (1 девочка, 7 мальчиков), в которой стандартная терапия была дополнена назначением иммуномодулятора — фармпрепарата Имунофан (рег. №: ЛС-002646 от 01.12.11), активной субстанцией которого является гексапептид — аргинил-альфа-аспартил-лизил-валил-тирозил-аргинин (ГП). Препарат разрешен к применению у детей старше 2 лет в комплексной терапии острых и хронических инфекционно-воспалительных заболеваний.

Дети ГИ2а получали ГП 45 мкг/мл 1 мл внутримышечно ежедневно 3 дня подряд, далее 3 раза через день, затем 4 дня ежедневно. Курсовая доза 450 мкг — 10 инъекций.

Пациентам обеих групп проводили оценку иммунного статуса:

Группа исследования 1 (ГИ1) – до оперативного вмешательства, до проведения стандартной терапии.

Группа исследования 1а (ГИ1а) – после проведения лечения, перед выпиской пациента из стационара.

Группа исследования 2 (ГИ2) – до оперативного вмешательства, до проведения комплексной терапии с включением ГП.

Группа исследования 2а (ГИ2а) – после проведения комплексного лечения с включением ГП, перед выпиской пациента из стационара.

Группу сравнения (ГС) составили 13 условно-здоровых детей соответствующего возраста.

Проводили определение содержания Т-лимфоцитов ($CD3^+CD19^-$, $CD3^+CD4^+$, $CD3^+CD8^+$, $CD3^+CD4^+/CD3^+CD8^+$) и В-лимфоцитов ($CD3^-CD19^+$), а также НК-лимфоцитов ($CD3^-CD16^+CD56^+$) на цитометре Cytomics FC-500 (Beckman Coulter, США) с использованием МкАТ (Beckman Coulter, США). Определяли уровень сывороточных IgA, IgM, IgG (ИФА, тест-системы АО «Вектор-Бест», г. Новосибирск). Проводили оценку фагоцитарной активности нейтрофильных гранулоцитов (НГ) с определением количества активно фагоцитирующих НГ (%ФАН), процессов захвата (ФЧ, ФИ) и степени завершенности фагоцитарного акта с оценкой киллинговой активности (%П, ИП) по отношению к *S. aureus* (штамм № 209) [7].

Проведенное исследование соответствует стандартам Хельсинкской декларации (Declaration Helsinki), одобрено независимым этическим комитетом ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России. У всех родителей получены письменные согласия на участие детей в исследовании.

Статистическую обработку результатов исследования проводили с использованием компьютерных программ Microsoft Excel 2016 и StatPlus 2010. Использовали методы непараметрической статистики: Me ($Q_{0,25}-Q_{0,75}$), U-критерий Манна–Уитни. Различия определяли статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

На момент обращения у пациентов отмечались субъективные признаки ООМ: заболевание начиналось остро, внезапно, нередко после провоцирующих факторов, короткого продромального периода от нескольких часов или 1–2 дней. Затем отмечался подъем температуры до 37,5–39,7 °С. Почти одновременно возникали интенсивные боли распирающего характера в пораженной конечности, обычно над очагом воспаления.

Развивалась болевая контрактура близлежащих к первичному очагу суставов. Конечность ребенка находилась в вынужденном положении.

Сроки поступления пациентов в стационар разнились от 2 до 16 суток, что связано как с поздней обращаемостью пациентов, так и с недостаточной настороженностью медицинских учреждений по м/ж.

Пациентам выполнялась следующая диагностика: ОАК, уровень СРБ, исследование иммунного статуса, пункции заинтересованных суставов, в том числе под контролем УЗИ, вскрытие пареоосальных флегмон (при необходимости их дренирование) с последующим бактериальным посевом отделяемого, иммобилизация пораженной конечности, инфузионная терапия, антибактериальная терапия курсами с учетом чувствительности к выделенным микроорганизмам.

Анализ общего количества лейкоцитов и их морфологии позволил выявить неадекватный ответ на воспалительный процесс как в ГИ1, так и ГИ2. В ГИ1 показатели количества лейкоцитов, лимфоцитов (ЛФ) и НГ не отличались от значений ГС ($p_{1,3} > 0,05$) (табл. 1). Однако среди НГ отмечалось незначительное повышение палочкоядерных форм (ПЯЛ) ($p < 0,05$) за счет снижения сегментоядерных НГ (СЯЛ) ($p < 0,05$) (табл. 1).

У детей с ООМ в ГИ2 в ПК было установлено незначительное повышение уровня лейкоцитов до 9,6 (9,0–16,5) против 4,6 (4,1–6,2) в ГС ($p < 0,05$), содержания НГ с увеличением доли ПЯЛ – 8,0 (7,0–9,3) ($p_{1,2} < 0,05$) и снижение количества ЛФ – 28,0 (18,5–29,0) % против 37,3 (33,4–38,5) % ($p < 0,05$) в ГС ($p > 0,05$) (табл. 1).

При изучении клеточного иммунитета у детей с ООМ в ГИ1 и ГИ2 были выявлены однонаправленные, одинаковые по степени выраженности дисфункции. В ГИ1 с ОГО отмечено снижение в 1,5 раза уровня Т-лимфоцитов $CD3^+CD19^-$ до $1,3 (1,1-1,6) \times 10^9/л$ против $1,9 (1,7-2,0) \times 10^9/л$ в ГС ($p < 0,05$), за счет параллельного уменьшения в 1,8 раза $Th-CD3^+CD4^+$ до 0,6 (0,5–0,9) против 1,1 (1,0–1,9) в ГС ($p < 0,05$), в 1,8 раза количества $T_{цтл}-CD3^+CD8^+$ ($p > 0,05$) и в 2,5 раза $NK-CD3^-CD16^+CD56^+$ до $0,2 (0,2-0,4) \times 10^9/л$ против $0,5 (0,3-0,4) \times 10^9/л$ в ГС ($p > 0,05$). При этом отмечалась выраженная тенденция увеличения содержания В-лимфоцитов $CD3^-CD19^+$ до 0,4 (0,3–0,5) против 0,3 (0,2–0,3) в ГС ($p > 0,05$) (табл. 2).

В ГИ2 детей ООМ также было установлено уменьшение содержания в 1,3 раза Т-лимфоцитов $CD3^+CD19^-$ до $1,5 (0,9-1,8) \times 10^9/л$ в ГС ($p < 0,05$) и 1,5 раза $Th-CD3^+CD4^+$ ($p < 0,05$), $T_{цтл}-CD3^+CD8^+$ ($p < 0,05$) и $NK-CD3^-CD16^+CD56^+$ ($p > 0,05$). Показатели содержания В-лимфоцитов $CD3^-CD19^+$ не отличались от показателей ГС ($p > 0,05$) (табл. 2). Показано, что

ТАБЛИЦА 1. СОДЕРЖАНИЕ ЛЕЙКОЦИТОВ У ДЕТЕЙ 8-15 ЛЕТ С ОСТРЫМ ОСТЕОМИЕЛИТОМ, Ме ($Q_{0,25}-Q_{0,75}$)

TABLE 1. CONTENT OF LEUKOCYTES IN CHILDREN 8-15 YEARS OLD WITH ACUTE OSTEOMYELITIS, Me ($Q_{0,25}-Q_{0,75}$)

Показатели Indicators	ГИ1 SG1 n = 11	ГИ2 SG2 n = 8	ГС CG n = 13
L, $10^9/л$ WBC, $10^9/л$	6,3 (6,0-7,0)	9,6 (9,0-16,5)* ^	4,6 (4,1-6,2)
ЛФ, % LY, %	42,0 (34,0-45,0)	28,0 (18,5-29,0)*	37,3 (33,4-38,5)
ЛФ, $10^9/л$ LY, $10^9/л$	2,1 (1,9-3,0)	2,5 (1,7-2,9)	2,5 (2,4-2,5)
НГ, % NG, %	49,5 (40,8-54,8)	61,0 (60,0-68,3)* ^	57,8 (54,3-59,8)
НГ, $10^9/л$ NG, $10^9/л$	3,1 (2,3-3,7)	6,0 (3,0-9,2)* ^	2,7 (2,6-3,3)
СЯЛ, % Segmented NG (SNG), %	44,0 (38,5-49,5)*	51,5 (51,0-61,0)	55,5 (54,1-58,0)
ПЯЛ, % Banded NG (BNG), %	5,00 (4,0-6,0)*	8,0 (7,0-9,3)* ^	2,5 (1,0-3,5)
МОН, % MON, %	7,00 (5,0-10,0)	9,0 (7,0-10,0)*	4,0 (3,3-5,8)
ЭОЗ, % EOS, %	3,0 (2,0-6,0)	4,0 (2,0-6,0)	3,5 (3,0-4,0)

Примечание. * – отличия показателей исследуемых групп с острым остеомиелитом от показателей условно здоровых детей, $p < 0,05$; ^ – различия между исследуемыми группами, $p < 0,05$.

Note. *, differences in the indicators of the studied groups with acute osteomyelitis from those of conditionally healthy children, $p < 0.05$; ^, differences between the studied groups, $p < 0.05$.

более выраженные дисфункции клеточного иммунитета, регистрируемые по изменению относительных показателей в ГИ2, были частично нивелированы за счет повышения общего количества лейкоцитов.

При анализе у детей с ООМ показателей гуморального иммунитета установлено, что в ГИ1 концентрации иммуноглобулинов IgA, IgM, IgG значимо не отличались от значений ГС ($p_{1-3} > 0,05$), а в ГИ2 отмечалось повышение концентрации IgG до 20,2 (20,0-23,9) г/л ($p < 0,05$) и IgA до верхних границ квартильной зоны ГС – 2,1 (1,8-2,6) г/л ($p > 0,05$) на фоне низких значений IgM 0,9 (0,8-1,3) г/л ($p > 0,05$) (табл. 2).

В результате проведения стандартной терапии в ГИ1а на фоне клинического улучшения состояния детей дисфункции клеточного и гуморального иммунитета, выявленные при ООМ до лечения, сохранялись ($p > 0,05$), отмечалось лишь снижение общего количества лейкоцитов до показателей ГС ($p < 0,05$) (табл. 2).

Применение иммуномодулирующей терапии в комплексе со стандартным лечением сопровождалось позитивными изменениями – восстановлением иммунологических показателей до

соответствующих значений ГС. Отмечалось повышение содержания Т-лимфоцитов CD3⁺CD19 до 1,7 (1,6-1,8) против 1,5 (0,9-1,8) до лечения в ГИ2, Th-CD3⁺CD4⁺ до 1,0 (0,9-1,1) $\times 10^9/л$ против 0,7 (0,6-0,9) $\times 10^9/л$ в ГИ2 ($p < 0,05$), а также T_{цтл}-CD3⁺CD8⁺ до 0,8 (0,7-0,9) $\times 10^9/л$ против 0,6 (0,5-0,7) $\times 10^9/л$ в ГИ2 ($p < 0,05$) и NK-CD3⁺CD16⁺CD56⁺ до 0,4 (0,3-0,5) $\times 10^9/л$ против 0,3 (0,2-0,5) $\times 10^9/л$ в ГИ2 ($p > 0,05$). Показано снижение до значений ГС концентраций IgA и IgG повышенных до лечения ($p_{1,2} < 0,05$) (табл. 2).

При ООМ обнаружены дефекты функционирования НГ. Выявлено, что у детей ГИ1 наблюдалось угнетение фагоцитарной активности, связанное со снижением доли активно фагоцитирующих НГ (%ФАН) ($p > 0,05$), нарушением функций захвата (ФЧ, ФИ) ($p_{1,2} < 0,05$) и процессов киллинга (%П, ИП) ($p_{1,2} < 0,05$) (табл. 3).

В ГИ2, напротив, наблюдалось повышение %ФАГ до 67,0 (58,5-71,5) % против 54,7 (51,0-57,0) % ($p < 0,05$), однако отмечалось снижение в 1,4 раза показателя ФЧ, отражающего способность НГ к захвату ($p < 0,05$), и так же, как в ГИ1, была снижена киллинговая способность клеток (%П, ИП, $p < 0,05$).

ТАБЛИЦА 2. ПОКАЗАТЕЛИ КЛЕТЧНОГО И ГУМОРАЛЬНОГО ИММУНИТЕТА У ДЕТЕЙ 8-15 ЛЕТ С ОСТРЫМ ОСТЕОМИЕЛИТОМ ДО И ПОСЛЕ ЛЕЧЕНИЯ, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 2. INDICATORS OF CELLULAR AND HUMORAL IMMUNITY IN CHILDREN AGED 8-15 YEARS WITH ACUTE OSTEOMYELITIS BEFORE AND AFTER TREATMENT, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

Показатели Indicators	ГИ1 до лечения SG1 before treatment n = 11	ГИ1а после лечения стандартная терапия SG1a after treatment, standard therapy n = 11	ГИ 2 до лечения SG2 before treatment n = 8	ГИ2а после лечения стандартная терапия + ГП SG1a after treatment standard therapy + HP n = 8	ГС условно здоровые дети CG healthy children n = 13
L, 10 ⁹ /л L, 10 ⁹ /L	6,3 (6,0-7,0)	4,6 ^s (4,4-5,4)	9,6* ^ (9,0-16,5)	4,8 [#] (4,6-6,8)	4,6 (4,1-6,2)
ЛФ, % LY, %	36,5 (25,5-40,8)	42,0 (36,3-46,0)	29,0* (19,5-30,0)	37,0 (33,5-51,0)	37,3 (33,4-38,5)
ЛФ, 10 ⁹ /л LY, 10 ⁹ /L	2,3 (1,8-2,8)	2,0* (1,5-2,3)	2,1^ (1,7-2,9)	2,5 [#] (2,4-2,6)	2,5 (2,4-2,5)
Т-лимфоциты CD3 ⁺ CD19 ⁻ , % T lymphocytes CD3 ⁺ CD19 ⁻ , %	60,8* (52,4-67,5)	69,6* (66,8-70,0)	58,7* (50,7-66,2)	68,9* (66,6-71,1)	75,8 (71,8-78,2)
Т-лимфоциты CD3 ⁺ CD19 ⁻ , 10 ⁹ /л T lymphocytes CD3 ⁺ CD19 ⁻ , 10 ⁹ /L	1,3* (1,1-1,6)	1,4* (1,2-1,6)	1,5 (0,9-1,8)	1,7 [#] (1,6-1,8)	1,9 (1,7-2,0)
Т-хелперы CD3 ⁺ CD4 ⁺ , % T helpers CD3 ⁺ CD4 ⁺ , %	33,2* (29,5-34,5)	37,8 (31,0-43,9)	35,7* (29,0-36,9)	42,1 (33,7-45,1)	46,9 (41,3-58,6)
Т-хелперы CD3 ⁺ CD4 ⁺ , 10 ⁹ /л T helpers CD3 ⁺ CD4 ⁺ , 10 ⁹ /L	0,6* (0,5-0,9)	0,7 (0,6-1,0)	0,7* (0,6-0,9)	1,0 [#] (0,9-1,1)	1,1 (1,0-1,9)
ЦТЛ CD3 ⁺ CD8 ⁺ , % CTL CD3 ⁺ CD8 ⁺ , %	27,7* (22,8-30,4)	28,8 (25,6-32,6)	22,5* (22,4-24,9)	32,9 [#] (28,9-40,3)	34,7 (31,4-38,9)
ЦТЛ CD3 ⁺ CD8 ⁺ , 10 ⁹ /л CTL CD3 ⁺ CD8 ⁺ , 10 ⁹ /L	0,5* (0,4-0,8)	0,6 (0,4-0,6)	0,6 (0,5-0,7)	0,8 [#] (0,7-0,9)	0,9 (0,7-1,0)
ИРИ CD4/CD8 IRI CD4/CD8	1,5 (1,2-1,6)	1,3 (1,1-1,5)	1,4 (1,2-1,6)	1,3 (1,1-1,5)	1,8 (1,5-2,0)
НК, % CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺	8,7* (7,0-13,3)	9,5* (6,5-12,2)	13,1 (10,0-20,1)	17,0 (11,3-18,2)	19,8 (17,1-19,9)
НК, × 10 ⁹ /л CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺ NK, × 10 ⁹ /L CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺	0,2* (0,2-0,4)	0,1* (0,1-0,2)	0,3 (0,2-0,5)	0,4 (0,3-0,5)	0,5 (0,3-0,5)
В-лимфоциты CD3 ⁺ CD19 ⁺ , % B lymphocytes CD3 ⁺ CD19 ⁺ , %	17,2 (11,8-19,7)	13,1 (10,0-20,1)	10,3 (9,9-14,1)	15,3* (11,2-17,3)	11,4 (9,2-7,7)

Таблица 2 (окончание)
Table 2 (continued)

Показатели Indicators	ГИ1 до лечения SG1 before treatment n = 11	ГИ1а после лечения стандартная терапия SG1a after treatment, standard therapy n = 11	ГИ 2 до лечения SG2 before treatment n = 8	ГИ2а после лечения стандартная терапия + ГП SG1a after treatment standard therapy + HP n = 8	ГС условно здоровые дети CG healthy children n = 13
В-лимфоциты CD3-CD19⁺, 10⁹/л B lymphocytes CD3-CD19 ⁺ , 10 ⁹ /L	0,4 (0,3-0,5)	0,3 (0,2-0,4)	0,3 (0,2-0,3)	0,4 (0,3-0,4)	0,3 (0,2-0,3)
IgA, г/л IgA, g/L	1,8 (1,5-2,2)	2,4 (2,0-2,6)	2,1 [^] (1,8-2,6)	1,6 [#] (1,5-1,8)	1,5 (1,4-2,6)
IgM, г/л IgM, g/L	1,1 (0,9-1,4)	1,3 (1,2-1,6)	0,9 (0,8-1,3)	1,2 (1,0-1,4)	1,4 (1,1-1,6)
IgG, г/л IgG, g/L	14,4 (12,4-16,5)	16,1 (13,4-18,3)	20,2 (20,0-23,9)	12,6 [#] (12,0-13,8)	13,2 (12,8-13,6)

Примечание. ГИ1 – показатели до лечения; ГИ1а – показатели после лечения (стандартная терапия); ГИ2 – показатели до лечения; ГИ2а – показатели после лечения (комплексная терапия с включением ГП); * – отличия показателей исследуемых групп с ООМ от показателей условно здоровых детей, $p < 0,05$; ^ – различия между показателями до лечения ГИ1 и ГИ2, $p < 0,05$; § – различия между показателями до лечения (ГИ1) и после лечения (ГИ1а), $p < 0,05$; # – различия между показателями до (ГИ2) и после лечения (ГИ2а), $p < 0,05$.

Note. SG1, indicators before treatment; SG1a, indicators after treatment (standard therapy); SG2, indicators before treatment; SG2a, indicators after treatment (complex therapy with the inclusion of HP); *, differences in the indicators of the studied groups with OM from the indicators of conditionally healthy children, $p < 0.05$; ^, differences between indicators before treatment of SG1 and SG2, $p < 0.05$; §, differences between indicators before treatment (SG1) and after treatment (SG1a), $p < 0.05$; #, differences between indicators before (SG2) and after treatment (SG2a), $p < 0.05$.

ТАБЛИЦА 3. ФАГОЦИТАРНАЯ ФУНКЦИЯ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ У ДЕТЕЙ 8-15 ЛЕТ С ОСТРЫМ ОСТЕОМИЕЛИТОМ ДО И ПОСЛЕ ЛЕЧЕНИЯ, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 3. PHAGOCYtic FUNCTION OF NEUTROPHIL GRANULOCYTES IN CHILDREN AGED 8-15 YEARS WITH ACUTE OSTEOMYELITIS BEFORE AND AFTER TREATMENT, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

Показатели Indicators	ГИ1 до лечения SG1 before treatment n = 11	ГИ1а после лечения стандартная терапия SG1a after treatment, standard therapy n = 11	ГИ 2 до лечения SG2 before treatment n = 8	ГИ2а после лечения стандартная терапия + ГП SG1a after treatment standard therapy + HP n = 8	ГС условно здоровые дети CG healthy children n = 13
%ФАН %PhAN	51,0* (42,8-58,3)	52,7 (48,9-54,0)	67,0* ^ (58,5-71,5)	66,0 (58,0-71,0)	54,7 (51,0-57,0)
ФЧ PhN	1,9* (1,7-2,3)	2,1 (1,9-2,5)	3,2* ^ (2,4-3,7)	3,9 (3,0-4,4)	4,4 (3,8-4,7)
ФИ PhI	1,0* (0,9-1,5)	1,3* (1,1-1,5)	2,0 (1,5-2,3)	2,4 [#] (2,0-2,7)	1,9 (1,7-2,2)
%П %D	41,9* (37,8-44,8)	49,2 [§] (44,0-51,2)	46,0* ^ (40,3-47,0)	58,8 [#] (57,4-60,6)	64,5 (62,6-66,9)
ИП DI	0,5* (0,3-0,7)	0,9 (0,7-1,3)	1,0* ^ (0,6-1,2)	1,3 (1,1-1,4)	1,7 (1,5-2,0)

Примечание. См. примечание к таблице 2.

Note. As for Table 2.

На фоне стандартной терапии в ГИ1а доля %ФАН, показатели, характеризующие процессы поглощения (ФЧ, ФИ) и переваривающую активность (%П, ИП), не отличались от показателей до лечения ($p_1 > 0,05$, $p_2 > 0,05$), не восстанавливались и были значительно ниже значений условно-здоровых детей ($p < 0,05$).

После курса комплексного лечения с включением ГП в ГИ2а отмечено: повышение переваривающей активности %П – 58,8 (57,4-60,6) % против 46,0 (40,3-47,0) % до лечения, усиление процессов захвата ФЧ – 3,9 (3,0-4,4) против 3,2 (2,4-3,7) до лечения ($p > 0,05$); ФИ – 2,4 (2,0-2,7) против 2,0 (1,5-2,3) ($p < 0,05$) до лечения при неменяющемся количестве активно фагоцитирующих НГ (%ФАН – 66,0 (58,0-71,0) % против 67,0 (58,5-71,5) % до лечения, $p > 0,05$).

На фоне проведенного хирургического лечения и проводимой иммуномодулирующей терапии в ГИ2а температура тела нормализовалась в сроки от 4 до 28 суток, а в ГИ1а на стандартной терапии – от 6 до 42 суток. Местный гнойно-воспалительный процесс (отек, гиперемия, отделяемое из послеоперационной раны) пациентов в ГИ2а купировался на 6-28-е сутки, в ГИ1а на 8-42-е сутки. В зависимости от сроков поступления в стационар, степени тяжести заболевания, локализации основного процесса, дети ГИ2а на-

ходились в стационаре от 11 до 41 суток, а ГИ1а от 14 до 45 суток.

Таким образом, получены позитивные клинико-иммунологические эффекты, демонстрирующие целесообразность использования иммуномодулирующей таргетной терапии с включением ГП в комплексном послеоперационном лечении детей с ООМ.

Заключение

Патогенетически обоснованное использование иммуностропного препарата Имунофан, активной субстанцией которого является ГП, в комплексном послеоперационном лечении ООМ способствует восстановлению нарушенных механизмов противоинфекционного иммунитета, более эффективной элиминации патогенов и, как следствие, улучшению клинического течения заболеваний, а также препятствует хронизации воспалительного процесса и усугублению дисфункции иммунной системы. Включение иммуномодулирующей терапии с использованием ГП в комплексное послеоперационное лечение позволило восстановить адекватность работы ИС, что привело к уменьшению длительности лихорадочного периода, проявлений интоксикации, более ранним срокам купирования гнойно-воспалительного процесса и количества дней пребывания в стационаре.

Список литературы / References

1. Абуджазар У.М., Альходжаев С.С., Жанкин Б.А., Жумагулов М.О., Смагулов А.Е., Нурлыбеков Д.К. Хронический остеомиелит и его клинико-иммунологическая характеристика // Вестник Казахского Национального медицинского университета, 2014. № 1. С. 246-248. [Alkhodzhayev S.S., Zhankin B.A., Kilybayev A.K., Zhumagulov M.O., Smagulov A.E., Nurlibekov D.K. Chronic osteomyelitis and its and immunological characteristics. *Vestnik Kazakhskogo Natsionalnogo meditsinskogo universiteta = Bulletin of the Kazakh National Medical University*, 2014, Vol. 1, pp. 246-248. (In Russ.)]
2. Белокрылов Н.М., Щепалов А.В., Антонов Д.В., Белокрылов А.Н., Жужгов Е.А. К вопросу об остеомиелите и его последствиях у детей: обзор литературы // Пермский медицинский журнал, 2020. Т. 37, № 3. С. 40-57. [Belokrylov N.M., Shepalov A.V., Antonov D.V., Belokrylov A.N., Zhuzhgov E.A. On the issue of osteomyelitis and its consequences in children: a literature review. *Permskiy meditsinskiy zhurnal = Perm Medical Journal*, 2020, Vol. 37, no. 3, pp. 40-57. (In Russ.)]
3. Бердиярова Ш.Ш., Юсупова Н.А. Особенности иммунометаболических нарушений, иммунологической реактивности при гематогенных остеомиелитах // Вестник науки и образования, 2021. Т. 5, № 108. С. 29-32. [Berdiyayeva Sh.Sh., Yusupova N.A. Features of immunometabolic disorders, immunological reactivity in hematogenous osteomyelitis. *Vestnik nauki i obrazovaniya = Bulletin of Science and Education*, 2021, Vol. 5, no. 108, pp. 29-32. (In Russ.)]
4. Гаврилюк В.П., Стагина М.И., Северинов Д.А., Машошина Л.О. Иммунные и метаболические нарушения при остром гематогенном остеомиелите у детей // Вятский медицинский вестник, 2022. № 1 (73). С. 90-96. [Gavrilyuk V.P., Statina M.I., Severinov D.A., Mashoshina L.O. Immune and metabolic disorders in acute hematogenous osteomyelitis in children. *Vyatkiy meditsinskiy vestnik = Vyatka Medical Bulletin*, 2022, no. 1 (73), pp. 90-96. (In Russ.)]
5. Жиронкин Р.В., Гаврилюк В.П., Костин С.В., Квачахия Л.Л. Иммунные нарушения при остром гематогенном остеомиелите у детей // Ученые записки Орловского государственного университета, 2014. Т. 2, № 7. С. 145-146. [Zhironkin R.V., Gavrilyuk V.P., Kostin S.V., Kvachakhia L.L. Immune disorders in acute

hematogenous osteomyelitis in children. *Uchenye zapiski Orlovskogo gosudarstvennogo universiteta = Scientific Notes of the Orel State University*, 2014, Vol. 2, no. 7, pp. 145-146. (In Russ.)]

6. Маркова Т. П., Чувиров Д. Г. Иммунофан в комплексном лечении детей с повторными респираторными заболеваниями и микоплазменной инфекцией // Эффективная фармакотерапия, 2022. Т. 18, № 12. С. 12-18. [Markova T.P., Chuvirov D.G. Immunotherapy with Imunofan to the Treatment of Children with Recurrent Respiratory Disease and Mycoplasma Pneumoniae Infection. *Effektivnaya farmakoterapiya = Effective Pharmacotherapy*, 2022, Vol. 18, no. 12, pp. 12-18. (In Russ.)]

7. Нестерова И.В., Чудилова Г.А., Ковалева С.В., Ломтатидзе Л.В., Колесникова Н.В., Евглевский А.А. Методы комплексной оценки функциональной активности нейтрофильных гранулоцитов в норме и патологии. Методические рекомендации. Краснодар, 2017. 52 с. [Nesterova I.V., Chudilova G.A., Kovaleva S.V., Lomtadidze L.V., Kolesnikova N.V., Yevlevsky A.A. Methods for comprehensive assessment of the functional activity of neutrophil granulocytes in health and disease (guidelines)]. Krasnodar, 2017. 52 p.

8. Chudilova G.A., Tarakanov V.A., Chicherev E.A., Teterin Yu.V., Barova N.K., Mitropanova M.N. Differentiated disorders of the immune system in acute hematogenic and acute posttraumatic osteomyelitis in children. *Medical Immunology (Russia)*, 2023, Vol. 25, no. 3, pp. 847-854. doi: 10.15789/1563-0625-DDO-2759.

9. de Mesy Bentley K.L., MacDonald A., Schwarz E.M., Oh I. Chronic osteomyelitis with Staphylococcus aureus deformation in submicron canaliculi of osteocytes: a case report. *JBJS Case Connect*, 2018, Vol. 8, no. 1, e8. doi: 10.2106/JBJS.CC.17.00154.

10. Gimza B.D., Cassat J.E. Mechanisms of antibiotic failure during staphylococcus aureus osteomyelitis. *Front. Immunol.*, 2021, Vol. 12, 638085. doi: 10.3389/fimmu.2021.638085.

11. Holtfreter S., Kolata J., Broker B.M. Towards the immune proteome of Staphylococcus aureus – the anti-S. aureus antibody response. *Int. J. Med. Microbiol.*, 2010, Vol. 300, pp. 176-192.

12. Kavanagh N., Ryan E.J., Widaa A., Sexton G., Fennell J., O'Rourke S., Cahill K.C., Kearney C.J., O'Brien F.J., Kerrigan S.W. Staphylococcal osteomyelitis: disease progression, treatment challenges, and future directions. *Clin Microbiol. Rev.*, 2018, Vol. 31, no. 2, e00084-17. doi: 10.1128/CMR.00084-17.

13. Muthukrishnan G., Masters E.A., Daiss J.L., Schwarz E.M. Mechanisms of immune evasion and bone tissue colonization that make staphylococcus aureus the primary pathogen in osteomyelitis. *Curr. Osteoporos. Rep.*, 2019, Vol. 17, no. 6, pp. 395-404.

14. Thakolkaran N., Shetty A.K. Acute hematogenous osteomyelitis in children. *Ochsner J.*, 2019, Vol. 19, no. 2, pp. 116-122.

15. Veis D.J., Cassat J.E. Infectious osteomyelitis: marrying bone biology and microbiology to shed new light on a persistent clinical challenge. *J. Bone Miner. Res.*, 2021, Vol. 36, no. 4, pp. 636-643.

Авторы:

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

Чичерев Е.А. — аспирант кафедры хирургических болезней детского возраста ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Краснодар, Россия

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

Чанурина В.Н. — ассистент кафедры клинической иммунологии, аллергологии и лабораторной диагностики ФПК и ППС ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Краснодар, Россия

Authors:

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

Chicherev E.A., Postgraduate Student, Department of Surgical Diseases of Childhood, Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation

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

Chapurina V.N., Assistant Professor, Department of Clinical Immunology, Allergology and Laboratory Diagnostics, Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation

Тараканов В.А. — д.м.н., профессор кафедры хирургических болезней детского возраста ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Краснодар, Россия

Барова Н.К. — к.м.н., доцент, заведующая кафедрой хирургических болезней детского возраста ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Краснодар, Россия

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

Tarakanov V.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Surgical Diseases of Childhood, Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation

Barova N.K., PhD (Medicine), Associate Professor, Head, Department of Surgical Diseases of Childhood, Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation

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

Поступила 09.07.2023
Отправлена на доработку 14.07.2023
Принята к печати 19.07.2023

Received 09.07.2023
Revision received 14.07.2023
Accepted 19.07.2023

ЭФФЕКТЫ ВЛИЯНИЯ РЕКОМБИНАНТНОГО IFN α 2b НА СОДЕРЖАНИЕ АНТИГЕНПРЕЗЕНТИРУЮЩЕЙ СУБПОПУЛЯЦИИ CD66b⁺CD16⁺CD33⁺HLA-DR⁺ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ У ДЕТЕЙ С ОСТРЫМ ОСТЕОМИЕЛИТОМ В СИСТЕМЕ *IN VITRO*

Нестерова И.В.^{1, 2}, Чудилова Г.А.¹, Тетерин Ю.В.¹, Чичерев Е.А.¹,
Чапурина В.Н.¹, Тараканов В.А.¹, Барова Н.К.¹

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

² ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы», Москва, Россия

Резюме. Условием распространения инфекционного процесса в кости при остром остеомиелите (ООМ) является негативное влияние *S. aureus*, нарушение его элиминации из-за дисфункции иммунной системы (ИС), в частности нейтрофильных гранулоцитов (НГ). Коррекция дисфункций НГ при ООМ через модуляцию фенотипа субпопуляций НГ под влиянием иммуотропных веществ и цитокинов представляет интерес. Цель исследования – уточнить эффекты влияния рекомбинантного IFN α 2b на количество и фенотип субпопуляций CD66b⁺CD16⁺CD33⁺HLA-DR⁺, CD66b⁺CD16⁺CD33⁺HLA-DR⁻ и фагоцитарную функцию нейтрофильных гранулоцитов при остром остеомиелите у детей в системе *in vitro*.

Проведено исследование образцов периферической крови (ПК) детей 8-15 лет: с ООМ (n = 24) – группа исследования 1 (ГИ1), условно здоровых детей (n = 13) – группа сравнения (ГС). ПК детей с ООМ инкубировали с рекIFN α 2b (50 МЕ/мкл, 60 мин, 37 °С) – группа исследования 1а (ГИ1а). До и после инкубации с рекIFN α 2b определяли количество НГ субпопуляций CD66b⁺CD16⁺CD33⁺HLA-DR⁺, CD66b⁺CD16⁺CD33⁺HLA-DR⁻ и плотность экспрессии рецепторов по интенсивности флюоресценции (MFI) (FC 500, Beckman Coulter, США), фагоцитарную активность НГ по содержанию активно-фагоцитирующих НГ (%ФАН), объему захваченного бактериального патогена *S. aureus* (штамм 209) по показателям – фагоцитарное число (ФЧ), фагоцитарный индекс (ФИ); для оценки киллинговой активности – процент переваривания (%П), индекс переваривания (ИП).

При ООМ была выявлена субпопуляция, экспрессирующая HLA-DR-рецептор – CD66b⁺CD16⁺CD33⁺HLA-DR⁺НГ, отсутствующая в ПК детей ГС, с праймированным фенотипом:

Адрес для переписки:

Чудилова Галина Анатольевна
ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский
университет» Министерства здравоохранения РФ
350063, Россия, г. Краснодар,
ул. Митрофана Седина, 4.
Тел.: 8 (918) 410-22-14.
E-mail: chudilova2015@yandex.ru

Address for correspondence:

Galina A. Chudilova
Kuban State Medical University
4 Mitrofan Sedin St
Krasnodar
350063 Russian Federation.
Phone: +7 (918) 410-22-14.
E-mail: chudilova2015@yandex.ru

Образец цитирования:

И.В. Нестерова, Г.А. Чудилова, Ю.В. Тетерин,
Е.А. Чичерев, В.Н. Чапурина, В.А. Тараканов,
Н.К. Барова «Эффекты влияния рекомбинантного
IFN α 2b на содержание антигенпрезентирующей
субпопуляции CD66b⁺CD16⁺CD33⁺HLA-DR⁺
нейтрофильных гранулоцитов у детей с острым
остеомиелитом в системе *in vitro*» // Российский
иммунологический журнал, 2023. Т. 26, № 4. С. 689-696.
doi: 10.46235/1028-7221-13769-IVE

© Нестерова И.В. и соавт., 2023

Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

I.V. Nesterova, G.A. Chudilova, Yu.V. Teterin, E.A. Chicherev,
V.N. Chapurina, V.A. Tarakanov, N.K. Barova “In vitro effects
of recombinant IFN α 2b on the content of antigen-presenting
CD66b⁺CD16⁺CD33⁺HLA-DR⁺ subset of neutrophils
in children with acute osteomyelitis”, Russian Journal
of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2023,
Vol. 26, no. 4, pp. 689-696.
doi: 10.46235/1028-7221-13769-IVE

© Nesterova I.V. et al., 2023

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

DOI: 10.46235/1028-7221-13769-IVE

увеличенной плотностью экспрессии активационных рецепторов CD16 и CD66b. Инкубация ПК при ООМ с рекIFN α 2b приводила к увеличению доли субпопуляции CD66b⁺CD16⁺CD33⁺HLA-DR⁺, активно фагоцитирующих НГ, и улучшению процессов переваривания.

В настоящем исследовании показано появление у детей с ООМ активированной субпопуляции «долгоживущих» НГ CD66b⁺CD16⁺CD33⁺HLA-DR⁺ со свойствами АПК представляющими АГ Т-лимфоцитам, с сохраняющимися эффекторными свойствами. В экспериментальной системе *in vitro* продемонстрировано позитивное влияние рекIFN α 2b, приводящее к увеличению количества НГ субпопуляции CD66b⁺CD16⁺CD33⁺HLA-DR⁺ и восстановлению фагоцитарной функции НГ по отношению к *S. aureus*, что может быть использовано в будущем для разработки новых подходов к оптимизации комплексной терапии в послеоперационном периоде лечения ООМ, профилактики осложнений и возможности реставрации нарушений в иммунной системе.

Ключевые слова: дети, острый остеомиелит, нейтрофильные гранулоциты, антигенстимулирующая субпопуляция, рекомбинантный IFN α 2b, фенотип

IN VITRO EFFECTS OF RECOMBINANT IFN α 2b ON THE CONTENT OF ANTIGEN-PRESENTING CD66b⁺CD16⁺CD33⁺HLA-DR⁺ SUBSET OF NEUTROPHILS IN CHILDREN WITH ACUTE OSTEOMYELITIS

**Nesterova I.V.^{a, b}, Chudilova G.A.^a, Teterin Yu.V.^a, Chicherev E.A.^a,
Chapurina V.N.^a, Tarakanov V.A.^a, Barova N.K.^a**

^a Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation

^b P. Lumumba Peoples' Friendship University, Moscow, Russian Federation

Abstract. Negative impact of *S. aureus*, seems to be a sufficient condition for the spread of the infectious process in the bone in acute osteomyelitis (AOM) due to its altered elimination caused by dysfunction of the immune system (IS), in particular, of neutrophilic granulocytes (NG). Correction of NG dysfunction in AOM under the influence of immunotropic substances and cytokines via modulation of the NG phenotypic subsets is of sufficient interest. Our aim was to evaluate the *in vitro* effects of recombinant IFN α 2b on the number and phenotype of CD66b⁺CD16⁺CD33⁺HLA-DR⁻, CD66b⁺CD16⁺CD33⁺HLA-DR⁺ subsets and on phagocytic function of neutrophilic granulocytes in acute osteomyelitis in children.

The study of peripheral blood (PB) samples from children aged 8-15 years was carried out as follows: patients with AOM (n = 24) comprised study group 1 (SG1), healthy children (n = 13) were included into comparison group (CG). PB samples of children with AOM were incubated with recIFN α 2b (50 IU/ μ L, 60 min, 37 °C.) in the study group 1a (SG1a). Before and after incubation with recIFN α 2b, the number of NG subsets CD66b⁺CD16⁺CD33⁺HLA-DR⁻, CD66b⁺CD16⁺CD33⁺HLA-DR⁺ and the density values of receptor expression by fluorescence intensity (MFI) were also determined (FC 500, Beckman Coulter, США). Phagocytic activity of NCs was evaluated as the contents of actively phagocytic NCs (%PhAN), volume of the engulfed *S. aureus* (strain 209) by assessing their phagocytic number (PhN), phagocytic index (PhI). Bacterial killing was determined as the percentages of microbe digestion (%D), digestion index (DI).

The cells from AOM patients revealed a subset expressing the HLA-DR receptor—CD66b⁺CD16⁺CD33⁺HLA-DR⁺NG, which is absent in the PB of CG children. The cells with primed phenotype exhibited an increased expression density of activation receptors CD16 and CD66b. Incubation of PB in AOM with recIFN α 2b led to an increased proportion of CD66b⁺CD16⁺CD33⁺HLA-DR⁺ NG subset which showed active phagocytosis and improved digestion processes. The present study shows the emergence of activated subset of “long-lived” CD66b⁺CD16⁺CD33⁺HLA-DR⁺ NCs in children with AOM. This subpopulation has APC features, by presenting AG to T lymphocytes, with preserved effector properties. In an *in vitro* experimental system, a positive effect of recIFN α 2b was demonstrated, leading to an increased number of NGs of the

CD66b⁺CD16⁺CD33⁺HLA-DR⁺ subset and recovery of *S. aureus* phagocytosis by NGs, thus being promising in the future for development of new approaches to optimization of complex therapy in the postoperative period of AOM treatment, prevention of complications and the opportunity to alleviate the disorders in the immune system.

Keywords: acute osteomyelitis, children, neutrophilic granulocytes, antigen-stimulating subpopulation, recombinant IFN α 2b, phenotype

Исследование выполнено в рамках государственного задания Министерства здравоохранения Российской Федерации № 121031000071-4.

Введение

Остеомиелит (ОМ) – гнойно-некротический процесс, развивающийся в кости и костном мозге (КМ), под воздействием высоко специфического патогенна *S. aureus*. *S. aureus* способен внедряться, колонизировать и размножаться в костной ткани, продуцируя факторы вирулентности: деградация тканей хозяина, прилипание к компонентам внеклеточного матрикса, образование биопленок, для уклонения от уничтожения фагоцитами [1, 2]. В ответ на это вырабатываются хемокины CXCL8, IL-1 β , CXCL2 и CCL3, которые привлекают и активируют большое количество НГ, создавая воспалительную среду, которая способствует образованию костно-резорбирующих остеокластов. Важнейшим условием распространения инфекционного процесса в кости является как негативное влияние самого *S. aureus*, так и нарушение его элиминации из-за дисфункции иммунной системы (ИС) и, в первую очередь, нейтрофильных гранулоцитов (НГ) [1, 15].

НГ являются фенотипически и функционально гетерогенными клетками, которые не только эффективно уничтожают патогены посредством фагоцитоза, продукции антимикробных пептидов, активных форм кислорода, секреции провоспалительных цитокинов и хемокинов, образования нейтрофильных экстрацеллюлярных сетей (NET), но и участвуют в перекрестных взаимодействиях с другими популяциями лейкоцитов, обеспечивая связь между врожденным и адаптивным иммунитетом [5, 10].

Показано, что НГ КМ, подвергшиеся воздействию GM-CSF, IL-3, TNF α , интерферонами (IFN γ) и бактериальными продуктами, экспрессируют на своей поверхности молекулы HLA класса II (MHC-II), дифференцируются в гибриды нейтрофил-DC, демонстрируя DC-подобный фенотип и антигенпрезентирующую функцию, сохраняя при этом свойства НГ [10, 13]. НГ могут влиять на адаптивный иммунный ответ, модулируя ответы CD4⁺T-клеток через молекулы MHC-II [9]. Кроме того, рецептор CD66b, экспрессируемый исключительно на

НГ, может функционировать как рецептор для галектина-3, который экспрессируется CD4⁺T-клетками памяти, на низком уровне – наивными T-клетками [9]. Взаимодействия рецептор-лиганд между T-клетками памяти и НГ инициируют экспрессию MHC-II на мембране НГ, происходит дальнейшая амплификация лигирования MHC-TCR, в результате активируется большее количество T-клеток, секретирующих цитокины, вызывающие увеличение экспрессии MHC-II на мембране НГ. Эта петля положительной обратной связи может играть центральную роль в индукции и поддержании презентации антигена НГ [9]. Установлено, что субпопуляции НГ, экспрессирующие HLA-DR, дополнительно экспрессируют ко-рецепторы CD80 и CD49d и характеризуются значительно увеличенной продолжительностью жизни. При этом «долгоживущие» НГ HLA-DR⁺ содержат больше миелопероксидазы (MPO), у них повышены фагоцитарный индекс и адгезия, их отличает ограниченная способность к хемотаксису и экзоцитозу первичных и вторичных гранул по сравнению с НГ-HLA-DR⁻[4]. При ООМ у детей нами была определена антигенпрезентирующая субпопуляция НГ CD66b⁺CD16⁺CD33⁺HLA-DR⁺, экспрессирующая высокоспецифические маркеры НГ (CD66b, CD16, CD33) и позитивная по HLA-DR [11].

CD66b (CEACAM8), GPI-заякоренный гликопротеин суперсемейства Ig, экспрессируется исключительно на НГ со стадии промиелоцитов, – маркер активации НГ [7]. CD16 (Fc γ RIII) рецептор – маркер палочкоядерных и сегментированных НГ и их активации. При контакте с антигеном происходит быстрая транслокация рецептора из цитоплазматического депо НГ на его поверхность. Повышенная экспрессия мембранных CD16 на НГ свидетельствует об активации клетки, а сниженная экспрессия или полное отсутствие CD16 характеризует незрелость НГ и/или «обратную дифференцировку» клетки, которая наблюдается при тяжелых бактериальных инфекциях или некрозах тканей [5]. CD33 (Siglec-3), принадлежит суперсемейству Ig, содержит два домена (IgV и IgC2) – маркер дифференцировки миелоидных клеток. Плотность экспрессии CD33 постепенно снижается от стадии миелобластов до сегментоядерных НГ. Вну-

триклеточная часть CD33 содержит ингибиторные мотивы на основе тирозина (ITIM), которые участвуют в ингибировании клеточной активности [8].

Следует подчеркнуть, что HLA-DR, который экспрессируется на миелобластах, отсутствует на зрелых НГ, но экспрессируется на поверхности тканевых НГ при хронических воспалительных состояниях [14]. Иммуный ответ на бактерии в костях имеет уникальные особенности по сравнению с другими инфицированными тканями и значительно модифицируется локальными факторами. Повышенная активация и функциональная способность НГ-HLA-DR⁺ предполагает наличие праймированного фенотипа [4], в связи с этим интерес представляет оценка возможности влияния на уровень экспрессии поверхностных рецепторов альтернативными иницирующими сигналами, в т. ч. на экспрессию HLA-DR НГ с целью возможной корректировки функций НГ.

Цель исследования – уточнить эффекты влияния рекомбинантного IFN α 2b на количество и фенотип субпопуляций CD66b⁺CD16⁺CD33⁺HLA-DR⁻, CD66b⁺CD16⁺CD33⁺HLA-DR⁺ и фагоцитарную функцию нейтрофильных гранулоцитов при остром остеомиелите у детей в системе *in vitro*.

Материалы и методы

Проведено исследование образцов периферической крови (ПК) 24 детей с острым (ООМ) 8-15 лет – группа исследования 1 (ГИ1). Группу сравнения (ГС) составили образцы ПК 13 здоровых детей в возрасте 8-15 лет.

Для оценки влияния рекомбинантного IFN α 2b образцы ПК детей с ООМ инкубировали с рекIFN α 2b (50 МЕ/мкл, 60 мин, 37 °С) – группа исследования 1a (ГИ1a).

До и после инкубации с рекIFN α 2b определяли количество НГ субпопуляций CD66b⁺CD16⁺CD33⁺HLA-DR⁺, CD66b⁺CD16⁺CD33⁺HLA-DR⁻ и плотность экспрессии рецепторов по интенсивности флуоресценции (MFI) (FC 500, Beckman Coulter, США), фагоцитарную активность НГ по содержанию активно-фагоцитирующих НГ (%ФАН), объему захваченного бактериального патогена *S. aureus* (штамм 209) по показателям – фагоцитарное число (ФЧ), фагоцитарный индекс (ФИ); для оценки киллинговой активности – процент переваривания (%П), индекс переваривания (ИП).

У всех законных представителей пациентов было получено информированное согласие на участие в исследовании и забор крови согласно WMA Declaration of Helsinki – Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects, 2013). Исследование одобрено локальным этическим

комитетом ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава РФ.

Статистическая обработка данных проводилась компьютерной программой Microsoft Excel 2016 и StatPlus 2020. После оценки нормальности распределения лабораторных показателей использовали критерии Вилкоксона–Манна–Уитни. Представление результатов в виде медианы (верхний и нижний квартиль) – Me (Q_{0,25}–Q_{0,75}). Определение статистически значимых различий при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Установлено, что в ПК условно-здоровых детей ГС регистрируется субпопуляция CD66b⁺CD16⁺CD33⁺HLA-DR⁻ доля которой составляет 98,8 (98,0-100)%. Фенотип данной субпопуляции: низкая плотность экспрессии маркеров НГ по MFI CD66b – 4,6 (4,2-5,0), CD33 – 3,7 (3,3-4,6) и средние значения MFI CD16 – 81,45 (69,3-99,2), характеризует зрелые палочкоядерные и сегментоядерные НГ [3].

В ПК ГИ1 детей с ООМ показано снижение в 1,4 раза доли НГ субпопуляции CD66b⁺CD16⁺CD33⁺HLA-DR⁻ до 71,2 (62,5-78,5)% относительно 98,8 (98,0-100)% в ГС ($p < 0,05$). При этом наблюдалась увеличение плотности экспрессии рецепторов по MFI CD16 до 114,5 (100,3- 139,0) против 81,45 (69,3-99,2) и CD66b до 6,2 (5,7-7,3) против 4,6 (4,2-5,0) ($p_{1,2} < 0,05$) и неменяющемся MFI CD33- 2,9 (2,5-3,4) ($p > 0,05$) относительно ГС, дополнительная транслокация внутриклеточных резервных пулов CD16, CD66b рецепторов на мембрану демонстрирует активированный фенотип НГ, способных к дегрануляции, окислительный взрыву и фагоцитозу НГ [4] (табл. 1).

В то же время при ООМ была выявлена субпопуляция экспрессирующая HLA-DR рецептор – CD66b⁺CD16⁺CD33⁺HLA-DR⁺НГ, отсутствующая в ПК детей ГС, доля которой составила 29,9 (18,4-37,6)%. Плотность экспрессии была определена по MFI HLA-DR – 2,2 (1,8-4,0), MFI CD33 – 3,5 (3,3-4,2), при этом плотность экспрессии рецепторов CD66b и CD16 была сопоставима с показателями субпопуляции CD66b⁺CD16⁺CD33⁺HLA-DR⁻НГ (табл. 1).

Инкубация ПК ГИ1 при ООМ с рекIFN α 2b приводила к перераспределению доли содержания субпопуляций CD66b⁺CD16⁺CD33⁺HLA-DR⁻, CD66b⁺CD16⁺CD33⁺HLA-DR⁺ (табл. 1).

Отмечалось снижение количества НГ субпопуляции CD66b⁺CD16⁺CD33⁺HLA-DR⁻ – 49,0 (41,4-61,1) % против 71,2 (52,5-80,5) % до инкубации ($p > 0,05$). При этом выявлено увеличение плотности экспрессии в 1,3 раза CD66b – 8,7 (7,6-8,9) против 6,23 (5,7-7,3) в ГИ1 ($p < 0,05$) и

ТАБЛИЦА 1. СОДЕРЖАНИЕ И ФЕНОТИП СУБПОПУЛЯЦИЙ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ CD66b⁺CD16⁺CD33⁺HLA-DR⁻ И CD66b⁺CD16⁺CD33⁺HLA-DR⁺ ПРИ ОСТРОМ ОСТЕОМИЕЛИТЕ ДО И ПОСЛЕ ИНКУБАЦИИ СИСТЕМЕ *IN VITRO* С РЕКОМБИНАНТНЫМ IFN α 2b, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 1. CONTENT AND PHENOTYPE OF CD66b⁺CD16⁺CD33⁺HLA-DR⁻ AND CD66b⁺CD16⁺CD33⁺HLA-DR⁺ NEUTROPHILIC GRANULOCYTE SUBSETS IN ACUTE OSTEOMYELITIS BEFORE AND AFTER *IN VITRO* INCUBATION WITH RECOMBINANT IFN α 2b, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

Показатели Indicators	Группа сравнения Comparison group n = 13	Группа исследования 1 до инкубации с рекIFN α 2b Study group 1 before incubation with reclFN α 2b n = 24	Группа исследования 1а после инкубации с рекIFN α 2b Study group 1a after incubation with reclFN α 2b n = 24
CD66b⁺CD16⁺CD33⁺HLA-DR⁻			
НГ, % NG, %	98,8 (98,0-100,0)	71,2* (62,5-78,5)	49,0* ^ (41,4-61,1)
MFI CD66b	4,6 (4,2-5,0)	6,2 (5,7-7,3)	8,7* ^ (7,6-8,9)
MFI CD16	81,5 (69,3-99,2)	114,5 (100,3-139,0)	104,7 (74,3-119,9)
MFI CD33	3,7 (3,3-4,6)	2,9 (2,5-3,4)	2,5* (2,1-2,5)
CD66b⁺CD16⁺CD33⁺HLA-DR⁺			
НГ, % NG, %	0	29,9* (18,4-37,6)	45,0* ^ (38,9-58,9)
MFI CD66b	0	8,20 (6,5-9,0)	8,7 (7,6-8,9)
MFI CD16	0	112,5 (100,3-137,0)	104,0 (73,7-120,8)
MFI CD33	0	3,5 (3,3-4,2)	3,5 (2,8-3,8)
HLA-DR	0	2,2 (1,8-4,0)	1,6 (1,5-2,0)

Примечание. * – значимые различия между показателями группы сравнения и группы исследования (ООМ), $p < 0,05$; ^ – значимые различия между показателями группы исследования до и после инкубации *in vitro* с рекIFN α 2b, $p < 0,05$.

Note. *, significant differences between the indicators of the comparison group and the study group (AOM) $p < 0.05$; ^, significant differences between the parameters of the study group before and after *in vitro* incubation with reclFN α 2b, $p < 0.05$.

снижение MFI CD33 до 2,5 (2,1-2,5) против 2,9 (2,5-3,4) до инкубации ($p < 0,05$). Выявлено отсутствие эффектов влияния рекIFN α 2b по отношению к MFI CD16 рецепторов (табл. 1).

При этом определялось более высокое количество НГ субпопуляции CD66b⁺CD16⁺CD33⁺HLA-DR⁺ – 45,0 (38,9-58,9) % против 29,9 (18,4-37,6) % ($p < 0,05$) в ГИ1 до инкубации с рекIFN α 2b. С плотностью экспрессии рецепторов CD66b, CD16, CD33 и HLA-DR не отличающихся от значений ГИ1 до инкубации ($p_{1-4} > 0,05$) (табл. 1).

При исследовании фагоцитарной функции после инкубации с рекIFN α 2b НГ в ГИ1а с ООМ в системе *in vitro* отмечено повышение %ФАГ до 76,0 (70,0-77,0) % против 51,0 (42,8-58,3) % ($p < 0,05$) в группе исследования и 54,7 (51,0-57,0) % в группе сравнения ($p < 0,05$). Также установлено увеличение киллинговой способности

НГ с 41,9 (37,8-44,8) % в группе исследования с ООМ до 57,4 (53,6-61,1) % ($p < 0,05$), т. е. практически до показателей группы сравнения 64,5 (62,6-66,9) ($p < 0,05$) (табл. 2).

Таким образом, данные полученные в результате проведенного эксперимента *in vitro* продемонстрировали возможность позитивного влияния рекIFN α 2b на функционирование НГ при ООМ. Установлено повышение содержания субпопуляции CD66b⁺CD16⁺CD33⁺HLA-DR⁺ «долгоживущих» НГ, обладающих уникальным профилем DC-подобных клеток с антигенпрезентирующей функцией, которые, по литературным данным, способны презентировать суперантиген *Staphylococcus enterotoxin E* (SEE) Т-клеткам, связываясь с молекулами МНС II класса [6]. «Долгоживущие» НГ, обладающих уникальным профилем DC-подобных клеток, продуцируют

ТАБЛИЦА 2. ЭФФЕКТЫ ВЛИЯНИЯ РЕКОМБИНАНТНОГО IFN α 2b НА ФАГОЦИТАРНУЮ ФУНКЦИЮ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ ПРИ ОСТРОМ ОСТЕОМИЕЛИТЕ *IN VITRO*, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 2. EFFECTS OF RECOMBINANT IFN α 2b ON THE PHAGOCYTTIC FUNCTION OF NEUTROPHILIC GRANULOCYTES IN ACUTE OSTEOMYELITIS *IN VITRO*, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

Показатели Indicators	Группа сравнения Comparison group n = 13	Группа исследования 1 до инкубации с рекIFN α 2b Study group 1 before incubation with reclFN α 2b n = 24	Группа исследования 1a после инкубации с рекIFN α 2b Study group 1a after incubation with reclFN α 2b n = 24
%ФАН %PhAN	54,7 (51,0-57,0)	51,0 (42,8-58,3)	76,0* ^ (70,0-77,0)
ФЧ PhN	4,4 (3,8-4,7)	1,9* (1,7-2,3)	2,7* (2,2-3,5)
ФИ PhI	1,9 (1,7-2,2)	1,0* (0,9-1,5)	2,0 (1,5-2,7)
%П %D	64,5 (62,6-66,9)	41,9* (37,8-44,8)	57,4* ^ (53,6-61,1)
ИП DI	1,7 (1,5-2,0)	0,5* (0,3-0,7)	0,9* (0,5-1,4)

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. As for Table 1.

значительные количества IL-8, IL-1 β , рецепторного антагониста IL-1, при этом не только сохраняя, но и усиливая эффекторные свойства короткоживущих НГ [3].

Результаты исследования также подтверждают гипотезу о способности НГ трансформироваться с «классического» фенотипа на фенотип «долгоживущих нейтрофилов» под влиянием от экстрацеллюлярного окружения клеток [3]. Детекция новой антигенпредставляющей субпопуляции НГ со смешанным нейтрофильно-дендритным фенотипом при остром остеомиелите у детей, возможно, связано с гнойно-инфекционным процессом, затрагивающим не только костные ткани, но и костный мозг. При этом следует отметить, что ранее появление молекул CD66b и HLA-DR на мембране НГ наблюдали только при хронических инфекционно-воспалительных заболеваниях (лейшманиоз) и аутоиммунных процессах (грануломатоз Вегенера и ревматоидный артрит) [4]. Выявленный нами эффект позитивного влияния IFN α 2b в системе *in vitro* демонстрирует пластичность субпопуляций CD66b⁺CD16⁺CD33⁺HLA-DR⁺ CD66b⁺CD16⁺CD33⁺HLA-DR: их трансфор-

мацию в сторону увеличения, субпопуляции с антигенпрезентирующими свойствами, что необходимо, с нашей точки зрения, для достижения полноценной регрессии гнойного воспалительного процесса.

Заключение

В настоящем исследовании показано появление у детей с ООМ активированной субпопуляции «долгоживущих» НГ CD66b⁺CD16⁺CD33⁺HLA-DR⁺ со свойствами АПК представляющими АГ Т-лимфоцитам [12] с сохраняющимися эффекторными свойствами.

В экспериментальной системе *in vitro*, продемонстрировано позитивное влияние рекIFN α 2b, приводящее к увеличению количества НГ субпопуляции CD66b⁺CD16⁺CD33⁺HLA-DR⁺ и восстановлению фагоцитарной функции НГ по отношению к *S. aureus*, что может быть использовано в будущем разработки новых подходов к оптимизации комплексной терапии в послеоперационном периоде лечения ООМ, профилактики осложнений и возможности реставрации нарушений в иммунной системе.

Список литературы / References

1. Белокрылов Н.М., Щепалов А.В., Антонов Д.В., Белокрылов А.Н., Жужгов Е.А. К вопросу об остеомиелите и его последствиях у детей: обзор литературы // Пермский медицинский журнал, 2020. Т. 37, № 3. С. 40-57. [Belokrylov N.M., Schepalov A.V., Antonov D.V., Belokrylov A.N., Zhuzhgov E.A. On the issue of osteomyelitis and its consequences in children: a literature review. *Permskiy meditsinskiy zhurnal = Perm Medical Journal*, 2020, Vol. 37, no. 3, pp. 40-57. (In Russ.)]

2. Гаврилюк В.П., Статина М.И., Северинов Д.А., Машошина Л.О. Иммунные и метаболические нарушения при остром гематогенном остеомиелите у детей // Вятский медицинский вестник, 2022. № 1 (73). С. 90-96. [Gavrilyuk V.P., Statina M.I., Severinov D.A., Mashoshina L.O. Immune and metabolic disorders in acute hematogenous osteomyelitis in children. *Vyatskiy meditsinskiy vestnik = Medical Newsletter of Vyatka*, 2022, no. 1 (73), pp. 90-96. (In Russ.)]
3. Chakravarti A., Rusu D., Flamand N., Borgeat P., Poubelle P.E. Reprogramming of a subpopulation of human blood neutrophils by prolonged exposure to cytokines. *Lab. Invest.*, 2009, Vol. 89, pp. 1084-1099.
4. Davis R.E., Sharma S., Conceição J., Carneiro P., Novais F., Scott P., Sundar S., Bacellar O., Carvalho E.M., Wilson M.E. Phenotypic and functional characteristics of HLA-DR⁺ neutrophils in Brazilians with cutaneous leishmaniasis. *J. Leukoc. Biol.*, 2017, Vol. 101, no. 3, pp. 739-749.
5. Elghetany M.T. Surface antigen changes during normal neutrophilic development: a critical review. *Blood Cells Mol. Dis.*, 2002, Vol. 28, no. 2, pp. 260-274.
6. Fanger N.A., Liu C., Guyre P.M., Wardwell K., O'Neil J., Guo T.L., Christian T.P., Mudzinski S.P., Gosselin E.J. Activation of human T cells by major histocompatibility complex class II-expressing neutrophils: proliferation in the presence of superantigen, but not tetanus toxoid. *Blood*, 1997, Vol. 89, pp. 4128-4135.
7. Grieshaber-Bouyer R., Nigrovic P.A. Neutrophil heterogeneity as therapeutic opportunity in immune-mediated disease. *Front. Immunol.*, 2019, Vol. 10, 346. doi: 10.3389/fimmu.2019.00346.
8. Hernández-Caselles T., Martínez-Esparza M., Pérez-Oliva A.B., Quintanilla-Cecconi A.M., García-Alonso A., Álvarez-López D.M., García-Peñarrubia P. A study of CD33 (SIGLEC-3) antigen expression and function on activated human T and NK cells: two isoforms of CD33 are generated by alternative splicing. *J. Leukoc. Biol.*, 2006, Vol. 79, no. 1, pp. 46-58.
9. Lin A., Loré K. Granulocytes: New members of the antigen-presenting cell family. *Front. Immunol.*, 2017, Vol. 8, 1781. doi: 10.3389/fimmu.2017.01781.
10. Matsushima H., Geng S., Lu R., Okamoto T., Yao Y., Mayuzumi N., Kotol P.F., Chojnacki B.J., Miyazaki T., Gallo R.L., Takashima A. Neutrophil differentiation into a unique hybrid population exhibiting dual phenotype and functionality of neutrophils and dendritic cells. *Blood*, 2013, Vol. 121, no. 10, pp. 1677-1689.
11. Nesterova I.V., Chudilova G.A., Teterin Yu.V., Chicherev E.A., Chapurina V.N., Mitropanova M.N. Antigen presenting subset of CD66b⁺CD16⁺CD33⁺HLA-DR⁺ neutrophilic granulocytes in acute osteomyelitis in children: Immunomodulating effects of immunotropic hexapeptide in an *in vitro* experimental system. *Medical Immunology (Russia)*, 2023, Vol. 25, no. 4, pp. 899-906. doi: 10.15789/1563-0625-APS-2776.
12. Polak D., Bohle B. Neutrophils-typical atypical antigen presenting cells? *Immunol. Lett.*, 2022, Vol. 247, pp. 52-58.
13. Reinisch W., Lichtenberger C., Steger G., Tillinger W., Scheiner O., Gangl A., Maurer D., Willheim M. Donor dependent, interferon- γ induced HLA-DR expression on human neutrophils *in vivo*. *Clin. Exp. Immunol.*, 2003, Vol. 133, no. 3, pp. 476-484.
14. Sandilands G.P., Mc Crae J., Hill K., Perry M., Baxter D. Major histocompatibility complex class II (DR) antigen and costimulatory molecules on *in vitro* and *in vivo* activated human polymorphonuclear neutrophils. *Immunology*, 2006, Vol. 119, no. 4, pp. 562-571.
15. Veis D.J., Cassat J.E. Infectious osteomyelitis: marrying bone biology and microbiology to shed new light on a persistent clinical challenge. *J. Bone Miner. Res.*, 2021, Vol. 36, pp. 636-643.

Авторы:

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

Authors:

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

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

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

Чичерев Е.А. — аспирант кафедры хирургических болезней детского возраста ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Краснодар, Россия

Чапурина В.Н. — ассистент кафедры клинической иммунологии, аллергологии и лабораторной диагностики ФПК и ППС ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Краснодар, Россия

Тараканов В.А. — д.м.н., профессор кафедры хирургических болезней детского возраста ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Краснодар, Россия

Барова Н.К. — к.м.н., доцент, заведующая кафедрой хирургических болезней детского возраста ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Краснодар, Россия

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

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

Chicherev E.A., Postgraduate Student, Department of Surgical Diseases of Childhood, Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation

Chapurina V.N., Assistant Professor, Department of Clinical Immunology, Allergology and Laboratory Diagnostics, Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation

Tarakanov V.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Surgical Diseases of Childhood, Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation

Barova N.K., PhD (Medicine), Associate Professor, Head, Department of Surgical Diseases of Childhood, Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation

Поступила 09.07.2023
Принята к печати 12.07.2023

Received 09.07.2023
Accepted 12.07.2023

КЛИНИЧЕСКАЯ И ИММУНОЛОГИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИММУНОМОДУЛИРУЮЩЕГО ГЕКСАПЕПТИДА, АССОЦИИРОВАННАЯ С ВОССТАНОВЛЕНИЕМ СУБПОПУЛЯЦИЙ CD11b⁺CD64⁻CD32⁺CD16⁺ И CD11b⁺CD64⁺CD32⁺CD16⁺ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ У ЖЕНЩИН С ХРОНИЧЕСКИМИ ИНФЕКЦИОННО-ВОСПАЛИТЕЛЬНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ ОРГАНОВ МАЛОГО ТАЗА

Ковалева С.В.¹, Нестерова И.В.^{1,2}, Чудилова Г.А.¹, Пиктурно С.Н.¹,
Ломтатидзе Л.В.¹

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

² ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы», Москва, Россия

Резюме. Одной из причин затяжного течения и рецидивирования хронических инфекционно-воспалительных заболеваний органов малого таза (ХВЗОМТ) является несостоятельность противоинфекционной иммунной защиты. Цель – оценить эффект влияния гексапептида (ГП) на негативно измененные субпопуляции нейтрофильных гранулоцитов (НГ) CD11b⁺CD64⁻CD32⁺CD16⁺ и CD11b⁺CD64⁺CD32⁺CD16⁺, их фенотип и ассоциированные с ними эффекторные функции у иммунокомпromетированных женщин с ХВЗОМТ.

Исследовали 35 женщин (20-40 лет) с ХВЗОМТ в период обострения – группа исследования 1 (ГИ1) и после лечения с включением гексапептида (ГП) 45 мкг/мл 1 мл внутримышечно 1 раз в сутки 10 дней – группа исследования 1а (ГИ1а). Группа сравнения (ГС) – 20 условно здоровых женщин. Определяли количество субпопуляций CD11b⁺CD64⁻CD32⁺CD16⁺НГ и CD11b⁺CD64⁺CD32⁺CD16⁺НГ и плотность экспрессии рецепторов, фагоцитарную и микробицидную функцию НГ.

Адрес для переписки:

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

Address for correspondence:

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

Образец цитирования:

С.В. Ковалева, И.В. Нестерова, Г.А. Чудилова,
С.Н. Пиктурно, Л.В. Ломтатидзе «Клиническая
и иммунологическая эффективность
иммуномодулирующего гексапептида, ассоциированная
с восстановлением субпопуляций CD11b⁺CD64⁻
CD32⁺CD16⁺ и CD11b⁺CD64⁺CD32⁺CD16⁺
нейтрофильных гранулоцитов у женщин
с хроническими инфекционно-воспалительными
заболеваниями органов малого таза» // Российский
иммунологический журнал, 2023. Т. 26, № 4. С. 697-704.
doi: 10.46235/1028-7221-13931-CAI
© Ковалева С.В. и соавт., 2023
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

S.V. Kovaleva, I.V. Nesterova, G.A. Chudilova,
S.N. Pikturno, L.V. Lomtadidze “Clinical and immunological
efficacy of immunomodulating hexapeptide associated
with the restoration of CD11b⁺CD64⁻CD32⁺CD16⁺ and
CD11b⁺CD64⁺CD32⁺CD16⁺ neutrophil granulocytes subset
in women with chronic infectious and inflammatory diseases
of the pelvic organs”, Russian Journal of Immunology/
Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2023, Vol. 26, no. 4,
pp. 697-704. doi: 10.46235/1028-7221-13931-CAI
© Kovaleva S.V. et al., 2023
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.46235/1028-7221-13931-CAI

В ГИ1 выявлено снижение количества мажорной субпопуляции CD11b⁺CD64⁻CD32⁺CD16⁺НГ ($p < 0,05$), тенденция к увеличению количества минорной субпопуляции CD11b⁺CD64⁺CD32⁺CD16⁺НГ ($p > 0,05$). В субпопуляции CD11b⁺CD64⁻CD32⁺CD16⁺НГ отмечено снижение уровня экспрессии CD16 в 1,4 раза, CD11b в 2 раза ($p_{1,2} < 0,05$). В минорной субпопуляции CD11b⁺CD64⁺CD32⁺CD16⁺НГ – уменьшение плотности экспрессии CD16 в 1,7 раз, CD11b в 2,1 раза ($p_{1,2} < 0,05$). Одновременно снижались фагоцитарная и микробицидная функции НГ. На фоне иммуномодулирующей терапии препаратом на основе ГП выявлены позитивные изменения иммунологических показателей. В ГИ1а наблюдалось увеличение количества мажорной субпопуляции НГ с увеличением плотности экспрессии CD16 в 1,2 раза, CD11b в 1,7 раза относительно ГИ1 ($p_{1,2} < 0,05$). Содержание минорной субпопуляции НГ имело тенденцию к снижению, и при этом плотность экспрессии CD16 достигла показателей ГС, а CD11b – увеличилась в 1,3 раза относительно ГИ1 ($p < 0,05$). Повысилось количество «активно фагоцитирующих» НГ и их киллинговой способности. Клинически наблюдался регресс симптомов обострения ХВЗОМТ в более короткие сроки и уменьшение частоты рецидивов через 6 месяцев после лечения в 88,6% случаев.

Позитивные иммуномодулирующие эффекты препарата на основе ГП на измененные субпопуляции НГ CD11b⁺CD64⁻CD32⁺CD16⁺ и CD11b⁺CD64⁺CD32⁺CD16⁺, их фенотип и ассоциированные с ними эффекторные функции демонстрируют возможности его применения для коррекции дисфункций НГ у иммунокомпрометированных женщин с ХВЗОМТ, что обеспечивает стойкую клинико-иммунологическую ремиссию и протективный эффект.

Ключевые слова: хронические воспалительные заболевания органов малого таза, нейтрофильные гранулоциты, фенотип, иммунокомпрометированность, иммунотерапия, гексапептид

CLINICAL AND IMMUNOLOGICAL EFFICACY OF IMMUNOMODULATING HEXAPEPTIDE ASSOCIATED WITH THE RESTORATION OF CD11b⁺CD64⁻CD32⁺CD16⁺ AND CD11b⁺CD64⁺CD32⁺CD16⁺ NEUTROPHIL GRANULOCYTES SUBSET IN WOMEN WITH CHRONIC INFECTIOUS AND INFLAMMATORY DISEASES OF THE PELVIC ORGANS

Kovaleva S.V.^a, Nesterova I.V.^{a,b}, Chudilova G.A.^a, Pikturno S.N.^a, Lomtadze L.V.^a

^a Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation

^b P. Lumumba Peoples' Friendship University, Moscow, Russian Federation

Abstract. Failure of anti-infectious immune protection is considered a reason for the prolonged course and recurrence of chronic infectious and inflammatory diseases of pelvic organs (PID). Our aim was to evaluate the effect of an original hexapeptide (HP) on negatively altered subpopulations of neutrophil granulocytes (NG) CD11b⁺CD64⁻CD32⁺CD16⁺ and CD11b⁺CD64⁺CD32⁺CD16⁺, their phenotype and associated effector functions in immunocompromised women with PID.

35 women (20–40 years old) with PID were studied during the period of clinical exacerbation (study group 1, SG1). Study group 1a (SG1a) consisted of patients who underwent treatment including the HP injections (45 mcg/mL, 1 ml intramuscularly once a day for 10 days). The comparison group (CG) consisted of 20 conditionally healthy women. The numbers of CD11b⁺CD64⁻CD32⁺CD16⁺NG and CD11b⁺CD64⁺CD32⁺CD16⁺NG cell subsets and the density of receptor expression, phagocytic and microbicidal function of NG were determined.

In SG1, decreased counts of the major NG subpopulation (CD11b⁺CD64⁻CD32⁺CD16⁺NG) was revealed ($p < 0,05$), with a trend for increase of minor subset CD11b⁺CD64⁺CD32⁺CD16⁺NG ($p > 0,05$). In the CD11b⁺CD64⁻CD32⁺CD16⁺NG subset, we noted a decreased expression of CD16 (1.4-fold), CD11b (2-fold) ($p_{1,2} < 0,05$). In the minor subset CD11b⁺CD64⁺CD32⁺CD16⁺NG, the expression densities were decreased in

CD16 (1.7-fold), CD11b (2.1-fold, $p_{1,2} < 0.05$). At the same time, the phagocytic and microbicidal functions of NG were found to be decreased. In the course of immunomodulatory therapy with the HP-based drug, positive changes in immunological parameters were revealed. In SG1a, an increased number of major NC subset was observed, with an increase in the expression density of CD16 by 1.2 times, CD11b by 1.7 times relative to SG1 ($p_{1,2} < 0.05$). The contents of minor NG subset tended to decrease, along with CD16 expression density reaching the indices of comparison group. CD11b increased 1.3 times relative to SG1 ($p < 0.05$). Higher ratios of actively phagocytizing NG and their killing ability have been registered. Clinically, we observed faster regression of clinical PID exacerbation symptoms and decreased frequency of relapses 6 months after treatment in 88.6% of cases. The positive immunomodulatory effects of the HP-based drug upon altered subsets of CD11b⁺CD64⁻CD32⁺CD16⁺ and CD11b⁺CD64⁺CD32⁺CD16⁺ NGs, their phenotype and associated effector functions suggest an opportunity of its usage for the correction of NG dysfunctions in immunocompromised women with PID, thus providing stable clinical and immunological remission and protective effect.

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

Введение

Несмотря на пристальное внимание исследователей к проблеме хронических воспалительных заболеваний органов малого таза (ХВЗОМТ), они по-прежнему занимают лидирующее место по частоте встречаемости среди гинекологических заболеваний [1, 2]. Частота хронических воспалительных заболеваний внутренних половых органов женщины обусловлена особенностями их клинического течения, создающими значительные трудности ранней диагностики воспалительного процесса, а также недостаточно высокой эффективностью стандартных методов лечения. Одной из причин затяжного течения воспалительного процесса и частого рецидивирования заболевания является несостоятельность защитных механизмов организма, которая проявляется в изменении клеточного и гуморального иммунитета, что способствует формированию или усугублению вторичной иммунной недостаточности и, как следствие, недостаточной эффективности стандартной терапии с развитием антибиотикорезистентности и преобладанием в качестве возбудителей условно-патогенных микроорганизмов и ко-инфицирования [5]. Хронические воспалительные процессы внутренних половых органов у женщин репродуктивного возраста следует рассматривать как общее полисистемное заболевание. Оно сопровождается вовлечением в патологический процесс систем, с которыми связано течение адаптационных процессов в организме женщины: иммунной, эндокринной, симпатoadреналовой, что свидетельствует о необходимости разработки комплексного подхода к лечению ХВЗОМТ с включением иммуномодулирующей терапии [4].

Одним из приоритетных направлений является изучение особенностей функционирования нейтрофильных гранулоцитов (НГ) при ХВЗОМТ, которые первыми осуществляют про-

тивобактериальную, противовирусную и противогрибковую защиту. Особый интерес представляет изучение рецепторного арсенала НГ, от которого зависит реализация полноценного иммунного ответа организма. «Противомикробная активность НГ ассоциирована с ведущими поверхностными мембранными рецепторами. CD16 (FcγRIII) – рецептор, отвечающий за цитотоксическое действие, дегрануляцию, кислородный взрыв и пролиферацию [3]. Повышение уровня экспрессии CD16 подтверждает функциональную активность НГ, а его низкий уровень на мембранной поверхности НГ характерен для незрелых НГ» [8]. «CD32 (FcγRII) – цитоплазматический иммунорецептор активации тирозина, экспрессия которого приводит в действие NADPH-оксидазный комплекс, опосредует эндцитоз, стимулирует секреторную активность, цитотоксическое действие и иммуномодулирующую функцию НГ» [9]. «CD11b (Mac-1 или рецептор к компоненту комплемента CR3a) – сигнальный партнер для других рецепторов, регулирует хемотаксис НГ в очаг воспаления, адгезию, фагоцитоз, респираторный взрыв и дегрануляцию. Следствием блокировки CD11b является дефект в активации Fcγ-рецепторов и нарушение фагоцитарной функции НГ» [6]. «CD64 (FcγRI) – рецептор практически не экспрессируется на мембране НГ периферической крови здоровых лиц, а только на активированных НГ. Повышение экспрессии CD64 на мембране НГ происходит при бактериальной инфекции. Рецепторы CD64 и CD11b являются диагностическими маркерами бактериальной инфекции, тяжести заболевания, продолжительности и исхода воспалительного процесса» [7, 10].

В литературе описаны положительные клинико-иммунологические эффекты различных иммуномодулирующих препаратов, однако вопрос изучения таргетного воздействия иммунотроп-

ных препаратов на дефектно функционирующие НГ остается открытым. Учитывая иммуномодулирующий эффект гексапептида (ГП, аргинил-альфа-аспартил-лизил-валил-тирозил-аргинин), являющегося синтетическим аналогом активного центра гомона тимуса тимопоэтина, представляет интерес возможность его влияния на фенотип и ассоциированную с ним функциональную активность НГ при лечении женщин с ХВЗОМТ.

Цель исследования – оценить эффект влияния гексапептида (ГП) на негативно измененные субпопуляции НГ CD11b⁺CD64⁺CD32⁺CD16⁺ и CD11b⁺CD64⁺CD32⁺CD16⁺, их фенотип и ассоциированные с ними эффекторные функции у иммунокомпрометированных женщин с ХВЗОМТ.

Материалы и методы

Проведено исследование НГ в образцах периферической крови (ПК) 35 женщин репродуктивного возраста от 20 до 40 лет с ХВЗОМТ в период обострения, поступивших в отделение дневного стационара Клиники ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России.

Были сформированы 2 группы исследования. Группа исследования 1 (ГИ1) – до начала комплексного лечения иммунокомпрометированных женщин с ХВЗОМТ в период обострения и группа исследования 1а (ГИ1а) – после комплексного лечения с включением иммуномодулирующей терапии. Группу сравнения составили 20 условно здоровых женщин репродуктивного возраста, обратившихся в клинику с целью контрацепции (установка внутриматочной спирали).

ХВЗОМТ у женщин ГИ1 характеризовались длительным анамнезом (более 5 лет), частыми обострениями (3 и более раз в год) и/или вялотекущим затяжным течением обострений, отсутствием стойкого клинического эффекта при использовании традиционной системной и местной противовоспалительной терапии.

В лечении использовали традиционные терапевтические подходы (антибактериальная, противогрибковая, противовоспалительная), а также дополнительно применяли иммуномодулирующую терапию, включающую препарат на основе ГП (действующее вещество лекарственного препарата Имунофан) в дозе 45 мкг/мл 1 мл внутримышечно 1 раз в сутки в течение 10 дней.

Тестирование НГ ПК проводилось у женщин с ХВЗОМТ до лечения (ГИ1) и через 2-3 дня после проведения комплексного лечения с включением препарата на основе ГП (ГИ1а) и у условно здоровых женщин.

В образцах периферической крови (ПК) определяли процентное содержания субпопуляций НГ (%НГ), одновременно несущих CD11b, CD64,

CD16, CD32-рецепторы, и плотность экспрессии данных рецепторов по MFI «методом проточной цитометрии (СУТОМІС FC500, США) с применением соответствующих моноклональных антител. Также была изучена фагоцитарная активность НГ с оценкой завершенности фагоцитоза со *S. aureus* (штамм 209), по показателям: количество активно фагоцитирующих НГ (%ФАН), процессов захвата (ФЧ, ФИ), переваривающей активности (%П, ИП); NADPH-оксидазная активность – по показателям спонтанного и стимулированного (*S. aureus*) NBT-теста, учитывая % формазан-позитивных НГ (%ФПК), средний цитохимический индекс (СЦИ), по соотношению %ФПКст/%ФПКсп рассчитывался коэффициент мобилизации (КМ)».

Для статистической обработки полученных данных использовались пакеты программ Microsoft Excel 2016, StatPlus 2010 и непараметрические тесты – критерии Вилкоксона и Манна–Уитни. Результаты выражали в виде медианы (верхний и нижний квартиль) – Me (Q_{0,25}-Q_{0,75}). Статистически значимыми различия принимали при p < 0,05.

Результаты и обсуждение

При оценке результатов исследования выявлено, что в образцах ПК группы сравнения (условно здоровые женщины) мажорная субпопуляция CD11b⁺CD64⁺CD32⁺CD16⁺НГ встречается в 94,90 (93,98-97,40) %, а минорная субпопуляция CD11b⁺CD64⁺CD32⁺CD16⁺НГ – в 1,24 (0,29-5,41) %.

У женщин ГИ1 в период обострения ХВЗОМТ выявлено снижение количественного состава мажорной субпопуляции, которая составила 87,6 (85,62-90,61)% (p < 0,05), а количество минорной субпопуляций имело тенденцию к увеличению и составило 5,44 (4,65;7,53)% относительно показателей группы сравнения (p > 0,05). Выявлена негативная трансформация фенотипа обеих субпопуляций. Так, в мажорной субпопуляции CD11b⁺CD64⁺CD32⁺CD16⁺НГ обращает на себя внимание снижение уровня экспрессии CD16 в 1,4 раза, CD11b в 2 раза (p < 0,05), а уровень CD32 не менялся относительно группы сравнения (p > 0,05). При этом в минорной субпопуляции CD11b⁺CD64⁺CD32⁺CD16⁺НГ отмечалось статистически значимое уменьшение плотности экспрессии CD16 по MFI – в 1,7 раза, CD11b в 2,1 раза (p < 0,05). Плотность экспрессии CD 32 также не менялась относительно группы сравнения (табл. 1).

Изменения содержания функционально-значимых субпопуляций и негативная трансформация их фенотипа влияют на способность НГ

ТАБЛИЦА 1. ИЗМЕНЕНИЕ СУБПОПУЛЯЦИЙ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ CD11b⁺CD64⁺CD32⁺CD16⁺, CD11b⁺CD64⁺CD32⁺CD16⁺ И ПЛОТНОСТИ ЭКСПРЕССИИ (MFI) ПОВЕРХНОСТНЫХ РЕЦЕПТОРОВ CD64, CD16, CD32, CD11b У ИММУНОКОМПРОМЕТИРОВАННЫХ ЖЕНЩИН В ПЕРИОД ОБОСТРЕНИЯ ХВЗОМТ И ПОСЛЕ КОМПЛЕКСНОГО ЛЕЧЕНИЯ С ВКЛЮЧЕНИЕМ ГЕКСАПЕПТИДА, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 1. CHANGES IN THE SUBSET OF NEUTROPHIL GRANULOCYTES CD11b⁺CD64⁺CD32⁺CD16⁺, CD11b⁺CD64⁺CD32⁺CD16⁺ AND THE EXPRESSION DENSITY (MFI) OF SURFACE RECEPTORS CD64, CD16, CD32, CD11b IN IMMUNOCOMPROMISED WOMEN DURING THE EXACERBATION OF PID AND AFTER COMPLEX TREATMENT WITH THE INCLUSION OF HEXAPEPTIDE, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

Показатель Indicator	Группа сравнения Comparison group	Группа исследования 1 (ГИ1) Study group (SG1)	Группа исследования 1а (ГИ1а) Study group 1a (SG1a)
CD11b⁺CD64⁺CD32⁺CD16⁺			
%НГ %NG	94,9 (93,98-97,40)	87,6 (85,62-90,61)*	92,74 (91,96-96,93)^
MFI CD16	118 (108,00-146,25)	86 (64,95-92,55)*	100,00 (96,40-126,00)^
MFI CD32	3,79 (3,50-4,73)	3,57 (2,93-4,84)	3,23 (2,93-3,70)
MFI CD11b	25,10 (21,60-27,15)	12,2 (9,57-17,00)*	21,1 (18,77-25,60)^
CD11b⁺CD64⁺CD32⁺CD16⁺			
%НГ %NG	1,24 (0,29-5,41)	5,44 (4,65-7,53)	3,33 (2,83-4,24)
MFI CD64	2,40 (2,07-5,06)	2,79 (1,73-7,61)	2,12 (1,76-2,71)
MFI CD16	149,00 (128,00-157,00)	89,9 (55,45-108,00)*	100,65 (75,82-129,75)
MFI CD32	5,84 (4,24-9,34)	5,71 (4,42-9,12)	4,24 (3,56-5,11)
MFI CD11b	33,70 (24,10-37,40)	15,8 (12,67-20,05)*	19,7 (17,70-23,00)*

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

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

полноценно осуществлять эффекторные функции. Выявлены дефекты функционирования системы НГ в виде отсутствия количественного прироста НГ в ответ на обострение хронического воспалительного процесса и снижения их эффекторных функций. Так, показано снижение %ФАН 54,0 (47,5-56,5) % против 61,0 (60,0-63,0) % в группе сравнения ($p < 0,05$), снижение переваривающей активности НГ – %П 40,6 (39,8-45,0) % против 56,0 (51,0-58,0) % в группе сравнения ($p < 0,05$), и ИП 0,8 (0,6-1,0) против 1,6 (1,4-2,4) в группе сравнения ($p < 0,05$). Нарушение NADPH-оксидазной активности связано отсутствием ответа как на воспалительный процесс в спонтанном NBT-тесте, так и на дополнительную индукцию *S. aureus* в стимулированном NBT-тесте (рис. 1). Дефекты эффекторных функций НГ иммунокомпрометированных женщин в период обострения ХВЗОМТ могут быть причиной поддержания хронического воспалительного процесса и отсутствия стойкого позитивного

эффекта от проводимой этиопатогенетической терапии.

На фоне проводимой иммуномодулирующей терапии выявлены позитивные изменения иммунологических показателей. Так, в ГИ1а выявлено увеличение количества мажорной субпопуляции НГ до 92,74 (91,96-96,93) % относительно ГИ1 – 87,6 (85,62-90,61) % ($p < 0,05$), которое достигло уровня условно здоровых женщин ($p > 0,05$). Также отмечалось увеличение плотности экспрессии CD16 в 1,2 раза и CD11b в 1,7 раза относительно ГИ1 ($p < 0,05$). Количество минорной субпопуляции НГ имело тенденцию к снижению до 3,33 (2,83-4,24) относительно ГИ1 – 5,44 (4,65-7,53) % ($p > 0,05$). При этом наблюдалось увеличение уровня экспрессии CD11b в 1,3 раза относительно ГИ1 ($p > 0,05$). Плотность экспрессии CD16 увеличилась до 100,65 (75,82-129,75) против 89,9 (55,45-108) в ГИ1, достигнув показателей группы сравнения 149,00 (128,00-157,00) ($p_{1,2} > 0,05$).

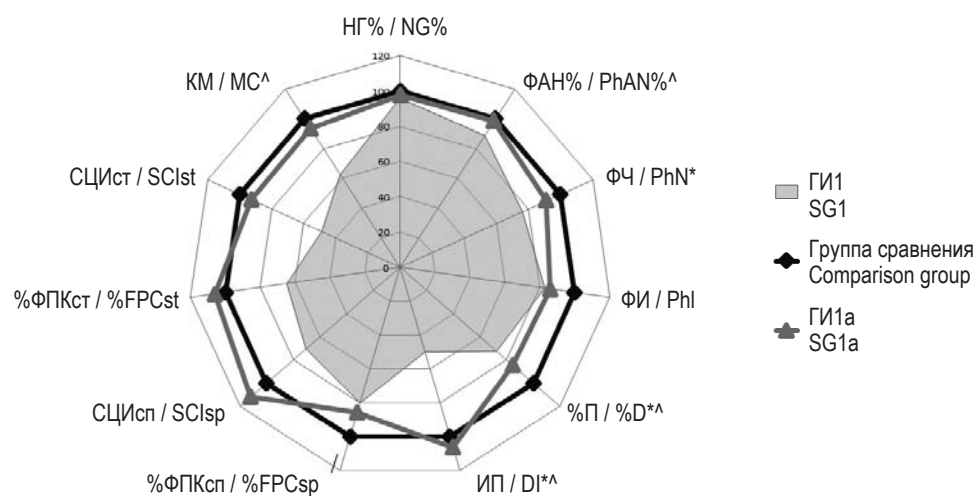


Рисунок 1. Показатели фагоцитарной и NADPH-оксидазной активности иммунокомпрометированных женщин в период обострения ХВЗОМТ на фоне лечения препаратом на основе гексапептида (процент от группы сравнения)

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

Figure 1. Indicators of phagocytic and NADPH-oxidase activity of immunocompromised women during the period of exacerbation of PID against the background of treatment with a hexapeptide-based drug (percentage of the comparison group)

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

Уровень экспрессии CD32 в обеих субпопуляциях НГ значимо не менялся.

Анализ показателей фагоцитарной и микробицидной активности НГ на фоне комплексной терапии с включением препарата на основе ГП выявил усиление фагоцитарной активности НГ, которое проявлялось в повышении количества «активно фагоцитирующих» НГ и, что особенно важно, киллинговой способности НГ. Так, в GI1a %П составил 47,3 (46,0-52,5) % против 40,6 (39,8-45,0) % в GI1 ($p < 0,05$) и достиг показателя группы сравнения 56,0 (51,0-58,0) ($p > 0,05$). Кроме того, отмечено и увеличение микробицидной активности каждого НГ – ИП составил 1,7 (1,5-3,0) против 0,8 (0,6-1,0) в GI1 и 1,6 (1,4-2,4) ($p < 0,05$) в группе сравнения ($p > 0,05$). Улучшение переваривающей активности НГ произошло, прежде всего, за счет активации кислородзависимых микробицидных механизмов (NADPH-оксидаз). При оценке NBT-теста отмечалось повышение %ФПК как в спонтанном, так и в стимулированном тесте с сохранением резервного потенциала НГ – КМ 2,0 (1,96-3,2) в GI1a после лечения против 1,34 (1,26-1,56) в GI1 до лечения ($p < 0,05$) (рис. 1).

Включение препарата на основе ГП в лечение иммунокомпрометированных женщин с ХВЗОМТ имело положительные иммунологические эффекты. Перепрограммирование негативно измененного фенотипа субпопуляций НГ в

GI1a связано с увеличением количества мажорной субпопуляции CD11b⁺CD64⁺CD32⁺CD16⁺НГ и уменьшением минорной субпопуляции CD11b⁺CD64⁺CD32⁺CD16⁺НГ, а также значительным изменением плотности экспрессии рецепторов, ответственных за эффекторные функции НГ – увеличением уровня экспрессии CD16 и CD11b в мажорной и минорной субпопуляциях. Кроме того, позитивные иммунологические эффекты связаны с восстановлением фагоцитарной и микробицидной активности НГ.

Одновременно на фоне комплексной терапии получены положительные клинические эффекты – регрессия воспалительного процесса при обострении ХВЗОМТ у иммунокомпрометированных женщин в виде уменьшения болевого синдрома, изменения характера и количества выделений из половых путей, субъективных ощущений. Оценка отдаленных результатов показала, что через 6 месяцев лечения в 88,6% случаев обострений ХВЗОМТ не было. Однако в 11,4% случаев возникло обострение ХВЗОМТ вследствие медицинских манипуляций (биопсия шейки матки, ЭКО с предшествующим введением глюкокортикостероидов) и незащищенных половых контактов. Кроме того, в 100% случаев как во время лечения препаратом на основе ГП, так и в более поздние сроки после лечения побочных эффектов иммунотерапии не зарегистрировано.

Заключение

Полученные в результате исследования иммуномодулирующие эффекты влияния препарата на основе ГП на негативно измененные субпопуляции НГ CD11b⁺CD64⁺CD32⁺CD16⁺, CD11b⁺CD64⁺CD32⁺CD16⁺, ассоциированные с нарушением эффекторных функций НГ, обосновывают возможность его использования в комплексной терапии у иммунокомпromетированных женщин с ХВЗОМТ в период обострения. Применение препарата на основе ГП позволило реорганизовать субпопуляционный состав НГ

и их оснащенность поверхностными мембранными рецепторами, что сопровождалось восстановлением их фагоцитарной и киллинговой активности. Позитивные иммуномодулирующие эффекты влияния препарата на основе ГП демонстрируют перспективные возможности его применения, направленные на коррекцию дефектного функционирования НГ у иммунокомпromетированных женщин с ХВЗОМТ в период обострения, что обеспечивает стойкую клинико-иммунологическую ремиссию и протективный эффект.

Список литературы / References

1. Гинекология: национальное руководство / Под ред. Г.М. Савельевой, Г.Т. Сухих, В.Н. Серова, В.Е. Радзинского, И.Б. Манухина. 2-е изд., перераб. и доп. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2017. 1008 с. [Gynecology: national guide / ed. G.M. Savelyeva, G.T. Sukhikh, V.N. Serov, V.E. Radzinsky, I.B. Manukhin. 2nd ed., revised and additional]. Moscow: GEOTAR-Media, 2017. 1008 p.
2. Зиганшин А.М., Мудров В.А. Оптимизация комплексной терапии воспалительных заболеваний органов малого таза у женщин // Гинекология, 2019. Т. 21, № 3. С. 30-34. [Ziganshin A.M., Mudrov V.A. Optimization of complex therapy of inflammatory diseases of women pelvic organs. *Ginekologiya = Gynecology*, 2019, Vol. 21, no. 3, pp. 30-34. (In Russ.)]
3. Нестерова И.В., Колесникова Н.В., Чудилова Г.А., Ломтатидзе Л.В., Ковалева С.В., Евглевский А.А., Нгуен Т.З.Л. Новый взгляд на нейтрофильные гранулоциты: переосмысление старых догм (Часть 2) // Инфекция и иммунитет, 2018. Т. 8, № 1. С. 7-18. [Nesterova I.V., Kolesnikova N.V., Chudilova G.A., Lomtatidze L.V., Kovaleva S.V., Evglevsky A.A., Nguyen T.D.L. The new look at neutrophilic granulocytes: rethinking old dogmas. Part 2. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2018, Vol. 8, no. 1, pp. 7-18. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-2017-3-219-230.
4. Смирнова Л.Е. Применение иммуномодулирующей терапии в комплексном лечении хронических воспалительных заболеваний внутренних половых органов // Consilium Medicum, 2010. Т. 12, № 6. С. 21-25. [Smirnova L.E. The use of immunomodulatory therapy in the complex treatment of chronic inflammatory diseases of the internal genital organs. *Consilium Medicum=Consilium Medicum*, 2010, Vol. 12, no. 6, pp. 21-25. (In Russ.)]
5. Darville T. Pelvic inflammatory disease due to neisseria gonorrhoeae and chlamydia trachomatis: immune evasion mechanisms and pathogenic disease pathways. *J. Infect. Dis.*, 2021, Vol. 224, no. 12, Suppl. 2, pp. 39-S46.
6. de Jong E., de Lange D.W., Beishuizen A., van de Ven P.M., Huisman A. Neutrophil CD64 expression as a longitudinal biomarker for severe disease and acute infection in critically ill patients. *Int. J. Lab. Hematol.*, 2016, Vol. 38, no. 5, pp. 576-584.
7. el-Madbouly A.A., el Sehemawy A.A., Eldesoky N.A., Abd Elgalil H.M., Ahmed A.M. Utility of presepsin, soluble triggering receptor expressed on myeloid cells-1, and neutrophil CD64 for early detection of neonatal sepsis. *Infect. Drug Resist.*, 2019, Vol. 12, pp. 311-319.
8. Hong C.W. Current understanding in neutrophil differentiation and heterogeneity. *Immune Netw.*, 2017, Vol. 17, no. 5, pp. 298-306.
9. Skilbeck C.A., Lu X., Sheikh S., Savage C.O., Nash G.B. Capture of flowing human neutrophils by immobilised immunoglobulin: Roles of Fc-receptors CD16 and CD32. *Cell. Immunol.*, 2006, Vol. 241, no. 1, pp. 26-31.
10. Yin W.P., Li J.B., Zheng X.F., An L., Shao H., Li C.S. Effect of neutrophil CD64 for diagnosing sepsis in emergency department. *World J. Emerg. Med.*, 2020, Vol. 11, no. 2, pp. 79-86.

Авторы:

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

Authors:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Поступила 10.07.2023
Принята к печати 12.07.2023

Received 10.07.2023
Accepted 12.07.2023

КЛИНИКО-ИММУНОЛОГИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ ИНТРАНАЗАЛЬНОГО ИНТЕРФЕРОНА В ПОСТВАКЦИНАЛЬНОМ ПЕРИОДЕ У ПАЦИЕНТОВ, ВАКЦИНИРОВАННЫХ ПРОТИВ КОРОНАВИРУСА SARS-CoV-2

**Савин Т.В.^{1,2}, Тюрина Т.О.², Миличкина А.М.^{1,2}, Дрозд И.В.¹,
Кузнецова Р.Н.^{1,2}, Симбирцев А.С.^{1,2}, Тотолян Арег А.^{1,2}**

¹ ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Санкт-Петербург, Россия

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

Резюме. Пандемия COVID-19, вызванная SARS-CoV-2, остается одной из самых актуальных медико-социальных проблем современности. Новая коронавирусная инфекция COVID-19 официально внесена в список опасных заболеваний. При инфицировании коронавирусами на фоне интенсивного образования индукторов воспаления происходит снижение уровня интерферонов (IFN) I типа, что приводит к снижению защитных способностей организма на фоне деструкции собственных тканей. Формирование коллективного иммунитета в результате проведения активной вакцинальной кампании с повышением доли лиц с протективным иммунитетом против коронавируса SARS-CoV-2 является важным фактором, позволяющим остановить распространение инфекционного процесса. Однако в первые дни при проведении вакцинации пациенты остаются восприимчивыми к возможному заражению. Перспективным профилактическим средством являются интерферон-содержащие препараты, широко применяемые в России и странах СНГ для профилактики и лечения вирусных инфекционных заболеваний, в частности ОРВИ и гриппа. В нашем исследовании показано, что интраназальный рекомбинантный IFN α -2b обладает клинико-иммунологической эффективностью при двукратном курсе препарата (в течение 5 дней после V1 и после V2 вакцинации вакциной «ЭпиВакКорона»).

Ключевые слова: интерферон, вакцинация, коронавирус SARS-CoV-2, иммунитет, пандемия, индекс позитивности

Адрес для переписки:

Кузнецова Раиса Николаевна
ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека 197101, Россия, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14.
Тел.: 8 (812) 644-63-17.
E-mail: kuznetzova.rais@yandex.ru

Address for correspondence:

Raisa N. Kuznetsova
Saint Petersburg Pasteur Institute
14 Mira St
St. Petersburg
197101 Russian Federation
Phone: +7 (812) 644-63-17.
E-mail: kuznetzova.rais@yandex.ru

Образец цитирования:

Т.В. Савин, Т.О. Тюрина, А.М. Миличкина, И.В. Дрозд, Р.Н. Кузнецова, А.С. Симбирцев, Арег А. Тотолян «Клинико-иммунологическая эффективность применения интраназального интерферона в поствакцинальном периоде у пациентов, вакцинированных против коронавируса SARS-CoV-2» // Российский иммунологический журнал, 2023. Т. 26, № 4. С. 705-712. doi: 10.46235/1028-7221-14715-CAI
© Савин Т.В. и соавт., 2023
Эта статья распространяется по лицензии Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

T.V. Savin, T.O. Tyurina, A.M. Milichkina, I.V. Drozd, R.N. Kuznetsova, A.S. Simbirtsev, Areg A. Totolian "Clinical and immunological efficacy of intranasal interferon in the post-vaccination period in patients vaccinated against SARS-CoV-2 coronavirus", Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2023, Vol. 26, no. 4, pp. 705-712. doi: 10.46235/1028-7221-14715-CAI
© Savin T.V. et al., 2023
The article can be used under the Creative Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.46235/1028-7221-14715-CAI

CLINICAL AND IMMUNOLOGICAL EFFICACY OF INTRANASAL INTERFERON IN THE POST-VACCINATION PERIOD IN PATIENTS VACCINATED AGAINST SARS-CoV-2 CORONAVIRUS

Savin T.V.^{a,b}, Tyurina T.O.^b, Milichkina A.M.^{a,b}, Drozd I.V.^a, Kuznetsova R.N.^{a,b}, Simbirtsev A.S.^{a,b}, Totolian Areg A.^{a,b}

^a Saint Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation

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

Abstract. The COVID-19 pandemic, caused by SARS-CoV-2, remains one of the actual medico-social issues of today's world. Novel coronavirus infection officially listed in dangerous infections. When an ingress of coronavirus infection in the background of intensive production of inflammatory inducers comes with decreased levels of type I interferon that cause loss of protective abilities of the body against the background of the destruction of its own tissues. Herd immunity development via vaccination increases the proportion of people with protective immunity against SARS-CoV-2 is an important factor in stopping the spread of the infection. However, during the first days after vaccination, patients remain susceptible to possible infection. A promising prophylactic agent is interferon-containing drugs widely used in Russia and CIS countries for the prevention and treatment of viral infectious diseases, in particular SARS and influenza. Our study showed that intranasal recombinant IFN α -2b has clinical and immunological efficacy after two courses of the drug (within 5 days after V1 and after V2 vaccination with the EpiVacCorona vaccine).

Keywords: interferon, vaccination, SARS-CoV-2 coronavirus, immunity, pandemic, positivity index

Введение

Пандемия COVID-19, вызванная SARS-CoV-2, остается одной из самых актуальных медико-социальных проблем современности. Новая коронавирусная инфекция COVID-19 официально внесена в список опасных заболеваний [1, 2]. Ее распространение охарактеризовано Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) 11 марта 2020 г. как пандемическое [2]. В период с декабря 2021 г. по апрель 2022 г. во всем мире зарегистрировано повышение заболеваемости этой инфекцией, которое достигло пика в январе 2022 г. (около 3 835 853 случаев на 21 января 2022 г.). В РФ в данный период наиболее значительное повышение заболеваемости регистрировалось в феврале 2022 г. (до 202 211 новых случаев на 11 февраля 2022 г.) с уменьшением до 18 796 случаев на 1 апреля 2022 г. На 21.01.2023 г. общее число зарегистрированных случаев новой коронавирусной инфекции SARS-CoV-2 в РФ составило 21 882 414 [16].

К настоящему времени не сформировалось полное понимание взаимодействия возбудителя болезни — вируса SARS-CoV-2 (Coronaviridae: Coronavirinae: Betacoronavirus: Sarbecovirus) и системы врожденного и адаптивного иммунитета организма-хозяина. Равным образом не существует единого и окончательно одобренного способа иммунотерапии этой инфекции. В качестве основного фактора иммунопатогенеза COVID-19 в публикациях разных исследователей рассма-

тривается дисбаланс иммунного ответа по отношению к возбудителю с недостаточным синтезом интерферонов (IFN) в начальном периоде болезни [1, 2, 6, 7].

Продемонстрировано, что внедрение SARS-CoV-2 обуславливает гиперактивацию провоспалительных факторов, повышение уровней экспрессии генов сигнальных белков с их каскадной гиперпродукцией. Активация рецепторов врожденного иммунитета инициирует каскад сигнальных путей с выработкой провоспалительных цитокинов. При инфицировании коронавирусами на фоне интенсивного образования индукторов воспаления происходит снижение уровней IFN I типа, что приводит к снижению защитных способностей организма на фоне деструкции собственных тканей [12, 14].

Сегодня научное сообщество постепенно начинает склоняться к представлению о том, что интерферонотерапия может быть наиболее эффективной при условии раннего назначения (в первые 5 дней поступления пациента) для комплексного лечения легкого и среднетяжелого течения COVID-19 с целью ускорения элиминации инфекционного агента, предотвращения осложнений и снижения смертности непосредственно от заболевания [1, 12].

Поскольку на данный момент не существует эффективного лечения от COVID-19, актуальной является разработка вакцин для предотвращения инфекции. Целью большинства вакцин является

индукция выработки широко нейтрализующих антител против SARS-CoV-2, способных взаимодействовать с вновь появляющимися штаммами коронавируса. Появление новых геновариантов коронавируса и широкий круг их хозяев, вероятно, связаны с более высокой частотой генетических рекомбинаций и мутаций в области RBD гена S, а также высокой частотой ошибок при репликации вируса по сравнению с другими РНК-содержащими вирусами [7, 10].

Формирование коллективного иммунитета в результате проведения активной вакцинальной компании с повышением доли лиц с протективным иммунитетом против коронавируса SARS-CoV-2 является важным фактором, позволяющим остановить распространение инфекционного процесса. Однако при проведении вакцинации в первые дни после применения любых вакцин, когда еще не успели выработаться защитные антитела, вакцинированные становятся восприимчивыми к возможному заражению. Вероятно, применение в этот период препаратов интерферона может защитить пациентов и сделать процесс вакцинации более эффективным.

Целью нашего исследования является изучение влияния рекомбинантного IFN α -2b человека (интраназальный препарат «Гриппферон», содержащий 3000 МЕ IFN α -2b) на заболеваемость в поствакцинальный период и на формирование противовирусного гуморального иммунитета при вакцинации пациентов против новой коронавирусной инфекции (НКВИ).

Материалы и методы

Всего было обследовано 816 человек в возрасте от 18 до 85 лет (женщины – 65%, мужчины – 45%). В качестве вакцины использован препарат «ЭпиВакКорона» производства НПО «Вектор» Роспотребнадзора (Новосибирск), который вводился пациентам согласно инструкции производителя. Вакцину вводили двукратно, внутримышечно с интервалом не менее 14-21 дня, в дозе 0,5 мл, в верхнюю треть наружной поверхности плеча - в область дельтовидной мышцы.

Были выделены следующие группы:

– 1-я группа – лица, привитые против НКВИ, получавшие препарат «Гриппферон» в виде назальных капель по 3 капли в каждый носовой ход (разовая доза – 3000 МЕ) 2 раза в день в течение 5 дней после каждого этапа вакцинации (614 человек, средний возраст 48 ± 17 лет).

– 2-я группа – лица, привитые против НКВИ, не получавшие препарат «Гриппферон» в поствакцинальном периоде (202 человека, средний возраст 47 ± 17 лет);

В обеих группах оценивались уровни антител и заболеваемость в поствакцинальный период.

Всем вакцинированным было проведено расширенное обследование, включающее сбор анамнеза, физикальный осмотр, лабораторные исследования (клинический анализ крови, общий анализ мочи, биохимический анализ крови, мазок методом ПЦР на новую коронавирусную инфекцию из носоглотки, определение количественных антител к N-белку SARS-CoV-2 и качественных антител IgG к белкам SARS-CoV-2.

Для определения уровня антител были использованы следующие тест-системы:

– Набор реагентов для иммуноферментного выявления иммуноглобулинов класса G к коронавирусу SARS-CoV-2 «SARS-CoV-2-ИФА-Вектор».

– «Набор реагентов для иммуноферментного количественного определения антител человека класса IgG к N-белку SARS-CoV-2 (N-CoV-2-IgG PS – НИИ им. Пастера),

Статистическая обработка полученных результатов проводилась в программе IBM SPSS Statistics 26.

Результаты и обсуждение

Вакцинопрофилактика людей с хронической патологией в настоящее время имеет важное значение. Профилактические прививки не только способствуют формированию у этого уязвимого контингента специфического иммунитета к иммуноуправляемым инфекциям, но и активируют систему врожденного иммунитета для защиты от новых, пока недостаточно изученных инфекционных заболеваний [3]. В рамках нашего исследования были привиты 49% лиц, страдающих хроническими заболеваниями (рис. 1). Патологических прививочных реакций и нежелательных явлений у вакцинированных зарегистрировано не было.

Среди привитых, страдающих хронической патологией, наибольшее количество составили пациенты с заболеваниями сердечно-сосудистой системы, нервной системы и опорно-двигательного аппарата – 56%. Из общего количества привитых аллергическими заболеваниями страдали 22%, пациенты с онкопатологией – 9%, с аутоиммунными заболеваниями – 13% (рис. 2).

Анализ количества заболевших новой коронавирусной инфекцией пациентов, имеющих только одну вакцинацию (V1) «ЭпиВакКорона», показал, что в 1-й группе (привитые против НКВИ, получавшие препарат «Гриппферон») заболело 130 пациентов (21,1%), во 2-й группе (привитые против НКВИ, не получавшие препарат «Гриппферон») – 38 человек (18,8%) (табл. 1).

Течение новой коронавирусной инфекции по степени тяжести у заболевших, имеющих только одну вакцинацию, в группах статистически

достоверно не отличалось. Таким образом, на данном этапе проведенных исследований можно предположить, что применение интерферона альфа-2b человеческого рекомбинантного в виде назальных капель 2 раза в день в течение 5 дней у пациентов, получивших только одну вакцинацию (V1) против коронавирусной инфекции вакциной «ЭпиваКорона», достоверно значимой

клинико-иммунологической эффективности не показало (табл. 2).

Нами также было проанализировано количество заболевших пациентов с новой коронавирусной инфекцией в обеих группах после проведения второй вакцинации вакциной «ЭпиВакКорона» в период с 21-го по 63-й день наблюдения. При проведении анализа было выявлено, что процент заболевших новой коронавирусной инфекцией во 2-й группе был достоверно выше в сравнении с показателем в первой группе, что позволило предположить эффективность применения IFN α -2b человеческого рекомбинантного («Гриппферон») после второго курса в виде назальных капель в поствакцинальный период после проведения V2 «ЭпиВакКороны» (табл. 3).

Анализ уровня иммуноглобулина-G к белкам SARS-CoV-2 показал, что индекс позитивности (ИП) у пациентов в 1-й группе на 21-й день (ИП = 23,2) после проведения V1 был выше в сравнении с показателем у пациентов 2-й группы (ИП = 17,6). Также отмечалось статистически достоверное различие в уровне ИП в группах на 42-й день. У пациентов, которые получили две вакцинации (V1+V2), ИП в 1-й группе был достоверно выше (ИП = 23,0) в сравнении с показателем во 2-й группе (ИП = 18,8) (рис. 3).

Наряду с растущим интересом к вакцинации, большое значение приобретают вопросы, связанные с формированием коллективного иммунитета. По своему происхождению коллективный иммунитет может иметь естественную или искусственную природу. В первом случае он формируется в результате естественного распространения возбудителя (в случае с COVID-19 это

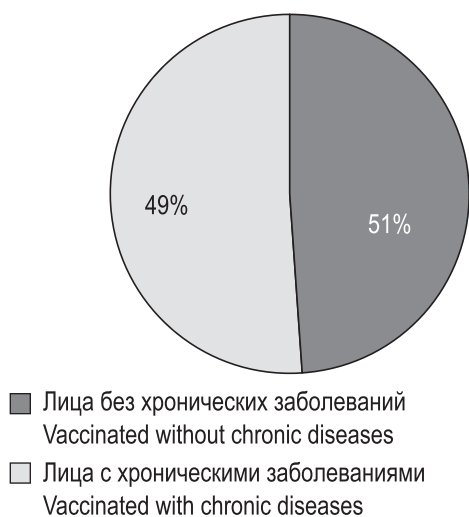


Рисунок 1. Привитые вакциной «ЭпиВакКорона»

Figure 1. Vaccinated with EpiVacCorona vaccine

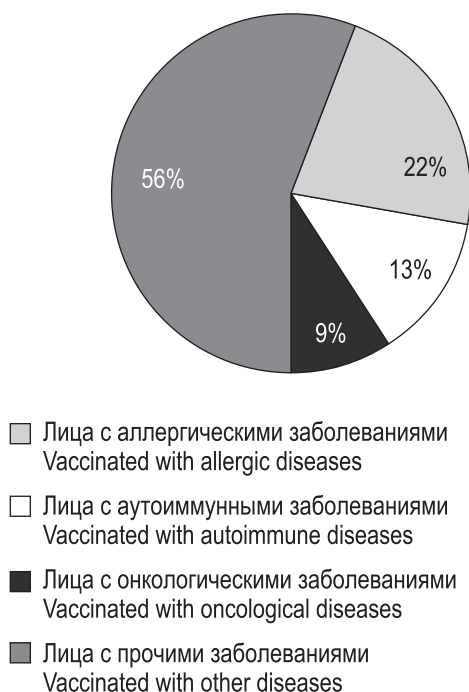
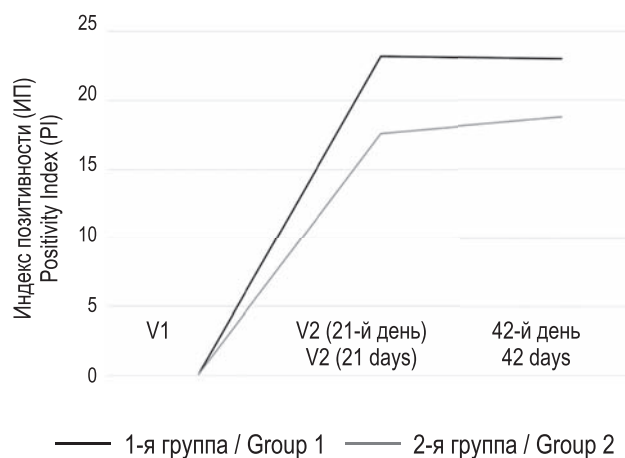


Рисунок 2. Распределение хронических заболеваний в группе привитых, страдающих хроническими заболеваниями

Figure 2. Distribution of chronic diseases in the group of vaccinated people suffering from chronic diseases



* U-критерий Манна-Уитни / U Mann-Whitney Criterion

Рисунок 3. Уровень IgG-антител к SARS-CoV-2, заболевших после V2 «ЭпиВакКороны»

Figure 3. Level of IgG antibodies to the SARS-CoV-2, who became ill after V2 EpiVacCorona

ТАБЛИЦА 1. КОЛИЧЕСТВО ЗАБОЛЕВШИХ КОРОНАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИЕЙ ПОСЛЕ ПРОВЕДЕНИЯ V1 «ЭпиВакКороны»

TABLE 1. THE NUMBER OF CASES OF CORONAVIRUS INFECTION AFTER THE V1 EpiVacCorona

Группа Group	Всего привито Group of total vaccinated	Количество заболевших вакцинированных Number of sick vaccinated	%
1-я группа Group 1 (n = 614)	614	130	21,1
2-я группа Group 2 (n = 202)	202	38	18,8
р			< 0,5

ТАБЛИЦА 2. АНАЛИЗ СТЕПЕНИ ТЯЖЕСТИ ТЕЧЕНИЯ КОРОНАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ У ЛИЦ, ЗАБОЛЕВШИХ ПОСЛЕ V1 «ЭпиВакКороны»

TABLE 2. ANALYSIS OF THE SEVERITY OF THE COURSE OF CORONAVIRUS INFECTION IN PATIENTS WHO BECAME ILL AFTER V1 EpiVacCorona

Группа Group	Всего заболевших Total cases (n)	Легкая степень тяжести Mild severity (n, %)	Средняя степень тяжести Moderate severity (n, %)	Тяжелая степень тяжести Severe severity (n, %)
1-я группа Group 1 (n = 614)	130	94 (72%)	27 (20,7%)	9 (6,9%)
2-я группа Group 2 (n = 202)	38	27 (71,6%)	9 (23,6%)	2 (5,2%)
р		< 0,8	< 0,8	< 0,9

ТАБЛИЦА 3. КОЛИЧЕСТВО ЗАБОЛЕВШИХ ПОСЛЕ V2 «ЭпиВакКороны»

TABLE 3. NUMBER OF SICK CASES AFTER V2 EpiVacCorona

Группа Group	Всего привито V2 Total vaccinated V2	Всего заболело после V2 Total sick after V2	%
1-я группа Group 1 (n = 614)	484	6	1,2
2-я группа Group 2 (n = 202)	164	7	4,2
р			< 0,01

SARS-CoV-2) в популяции восприимчивых индивидумов, во втором – в результате применения специфических вакцин [5]. Впервые на территории Российской Федерации в национальном масштабе проведено поперечное исследование серопревалентности к Nc SARS-CoV-2. Общий уровень сероконверсии варьировал в пределах 19,5 (10,0-25,6) % [7].

Полноценный иммунный ответ на введение вакцины формируется 21-42 дня, поэтому после вакцинации в течение этого периода необходимо соблюдать все меры предосторожности, чтобы не заразиться коронавирусной инфекцией. Люди постоянно заражаются различными микроорганизмами, обитающими в дыхательных путях. Особенно опасны смешанные инфекции,

которые, как правило, утяжеляют течение заболевания и препятствуют эффективному эпидемиологическому контролю за респираторными инфекциями. В контексте SARS-CoV-2 во время пандемии COVID-19 люди могут быть коинфицированы вирусом гриппа; вирусом, вызывающим ОРВИ; другими, не респираторными патогенами (бактериями, грибами и микоплазмами). Каждый из этих вариантов может осложнить течение и лечение COVID-19 [10].

Перспективным профилактическим средством являются интерферон-содержащие препараты, широко применяемые в России и странах СНГ для профилактики и лечения вирусных инфекционных заболеваний, в частности ОРВИ и гриппа. В нашем исследовании показано, что интраназальный рекомбинантный IFN α -2b обладает клинико-иммунологической эффективностью при двукратном введении препарата (в течение 5 дней после V1 и после V2 вакцинации вакциной «ЭпиВакКорона»). Кроме того, применение интраназального интерферона вызвало увеличение титров противовирусных антител, что может свидетельствовать о положительном влиянии препарата в целом на вакцинальный процесс. Вероятно, применение интраназального интерферона увеличивает эффективность вакцинации против коронавируса SARS-CoV-2. Эффективность препаратов рекомбинантного интерферона также продемонстрирована в других исследованиях для лечения больных с НКИ [10]. Рекомбинантный IFN α -2b, применяемый в лекарственной форме «суппозитории – ректальные», в концентрациях 800, 400, 200, 100 и 50 МЕ/мл показал высокую биологическую активность, выражающуюся в ингибировании ре-

пликации штамма SARS-CoV-2 в обеих заражающих дозах как при оценке через 24 ч, так и через 48 ч после инфицирования клеток. «Профилактическая» схема применения была более эффективной в сравнении с «терапевтической». Также показано, что IFN α -2b способен ингибировать *in vitro* репликацию генотипически близкого к SARS-CoV-2 коронавируса SARS-CoV [10].

Заключение

1. Полученные первые результаты исследования, при проведении анализа местного применения IFN α -2b человеческого рекомбинантного («Гриппферон») в виде назальных капель указывают на то, что клинико-иммунологическая эффективность препарата отмечается при двукратном курсе препарата (в течение 5 дней после V1 и после V2 вакцинации вакциной «ЭпиВакКорона»).

2. Анализ уровня IgG-антител к белкам SARS-CoV-2 на 21-й и 42-й дни показал, что индекс позитивности у лиц, получивших IFN α -2b человеческий рекомбинантный в виде назальных капель был статистически достоверно выше в сравнении с показателями в группе привитых, не получивших интерферон альфа-2b человеческий рекомбинантный.

3. Выявленные различия в уровнях ИП позволяют предположить, что для дальнейшего анализа и прогнозирования течения поствакцинального периода у пациентов необходимо более глубокое иммунологическое исследование, включающее определение местной продукции иммуноглобулинов в носоглотке, включая секреторные антитела и анализ местного цитокинового профиля.

Список литературы / References

1. Исакова-Сивак И.Н., Руденко Л.Г., Бартов М.С., Выжлова Е.Н., Малиновская В.В. Противовирусная активность препарата Виферон в форме суппозиторий ректальных *in vitro* в отношении SARS-CoV-2 // Инфекция и иммунитет, 2022, Т. 12, № 1. С. 142-148 [Isakova-Sivak I.N., Rudenko L.G., Bartov M.S., Vyzhlova E.N., Malinovskaya V.V. Antiviral activity of the drug Viferon in the form of rectal suppositories *in vitro* against SARS-CoV-2. *Infektsia i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2022, Vol. 12, no. 1, pp. 142-148 (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-IVA-1708.
2. Киселева И.В., Ларионова Н.В., Григорьева Е.П., Ксенафонтов А.Д., Аль Фаррух М., Руденко Л.Г. Особенности циркуляции респираторных вирусов в пред- и пандемические по гриппу и COVID-19 периоды // Инфекция и иммунитет, 2021. Т. 11, № 6. С. 1009-1019 [Kiseleva, I.V., Larionova N.V., Grigorieva E.P., Ksenafontov A.D., Al Farrukh M., Rudenko L.G. Features of the circulation of respiratory viruses in pre- and pandemic influenza and COVID-19 periods. *Infektsia i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2021, Vol. 11, no. 6, pp. 1009-1019 (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-SFO-1662.
3. Костинов М.П., Харсеева Г.Г., Тюкавкина С.Ю. Вакцинация людей с хронической патологией // Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение, 2021. Т. 10, № 2. С. 99-108. [Kostinov M.P., Kharseeva G.G., Tyukavkina S.Yu. Vaccination of people with chronic pathology. *Infektsionnye bolezni: novosti, mneniya, obuchenie = Infectious Diseases: News, Opinions, Education*, 2021. Vol. 10, no. 2, pp. 99-108 (In Russ.)]

4. Рыжиков А.Б., Рыжиков Е.А., Богрянцева М.П., Усова С.В., Даниленко Е.Д., Нечаева Е.А., Пьянков О.В., Пьянкова О.Г., Гудымо А.С., Боднев С.А., Онхонова Г.С., Слепцова Е.С., Кузубов В.И., Рындюк Н.Н., Гинько З.И., Петров В.Н., Моисеева А.А., Торжкова П.Ю., Пьянков С.А., Трегубчак Т.В., Антонец Д.В., Гаврилова Е.В., Максютов Р.А. Простое слепое плацебо-контролируемое рандомизированное исследование безопасности, реактогенности и иммуногенности вакцины «ЭпиВакКорона» для профилактики COVID-19 на добровольцах в возрасте 18–60 лет (фаза I–II) // *Инфекция и иммунитет*, 2021. Т. 11, № 2. С. 283–296. [Ryzhikov A.B., Ryzhikov E.A., Bogryantseva M.P., Usova S.V., Danilenko E.D., Nechaeva E.A., Pyankov O.V., Pyankova O.G., Gudymo A.S., Bodnev S.A., Onkhonova G.S., Sleptsova E.S., Kuzubov V.I., Ryndyuk N.N., Ginko Z.I., Petrov V.N., Moiseeva A.A., Torzhkova P.Yu., Pyankov S.A., Tregubchak T.V., Antonets D.V., GavriloVA E.V., Maksyutov R.A. A simple blind placebo-controlled randomized study of the safety, reactogenicity and immunogenicity of the EpiVacCorona vaccine for the prevention of COVID-19 on volunteers aged 18-60 years (phase I–II). *Infektsia i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2021. Vol. 11, no. 2, pp. 283–296. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-ASB-1699.
5. Сизякина Л.П., Андреева И.И., Харитоновна М.В., Зайцева Н.С., Любимов Д.С., Закурская В.Я., Тотолян Арег А. Фенотипы поствакцинального иммунитета при использовании вакцины «ЭпиВакКорона» у лиц, перенесших COVID-19 // *Медицинская иммунология*, 2022. Т. 24, № 2. С. 367–378. [Sizyakina L.P., Andreeva I.I., Kharitonova M.V., Zaitseva N.S., Lyubimov D.S., Zakurskaya V.Ya., Totolyan Areg A. Phenotypes of post-vaccination immunity when using the EpiVacCorona vaccine in people who have undergone COVID-19. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2022, Vol. 24, no. 2, pp. 367–378. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-PVI-2457.
6. Beilharz M.W., Cummins M.J., Bennett A.L., Cummins J.M. Oromucosal administration of interferon to humans. *Pharmaceuticals (Basel)*, 2010, Vol. 3, no. 2, pp. 323–344.
7. Gao L., Yu S., Chen Q., Duan Z., Zhou J., Mao C., Yu D., Zhu W., Nie J., Hou Y. A randomized controlled trial of low-dose recombinant human interferons alpha-2b nasal spray to prevent acute viral respiratory infections in military recruits. *Vaccine*, 2010, Vol. 28, no. 28, pp. 4445–4451.
8. Chen J. Pathogenicity and transmissibility of 2019-nCoV-A quick overview and comparison with other emerging viruses. *Microbes Infect.*, 2020, Vol. 22, no. 2, pp. 69–71.
9. 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 I.M. Jr, 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.
10. Cui X., Wang Y., Zhai J., Xue M., Zheng C., Yu L. Future trajectory of SARS-CoV-2: Constant spillover back and forth between. *Virus Res.*, 2023, 328, 199075. doi: 10.1016/j.virusres.2023.199075.
11. Hung I.F.N., Lung K.C., Tso E.Y.K., Liu R., Chung T.W.H., Chu M.-Y., Ng Y.-Y., Lo J., Chan J., Tam A.R., Shum H.-P., Chan V., Wu A.K.-L., Sin K.-M., Leung W.-S., Law W.-L., Lung D.C., Sin S., Yeung P., Yip C.C.-Y., Zhang R.R., Fung A.Y.-F., Yan E.Y.-W., Leung K.-H., Ip J.D., Chu A.W.-H., Chan W.-M., Ng A.C.-K., Lee R., Fung K., Yeung A., Wu T.-C., Chan J.W.-M., Yan W.-W., Chan W.-M., Chan J.F.-W., Lie A.K.-W., Tsang O.T.-Y., Cheng V.C.-C., Que T.-L., Lau C.-S., Chan K.-H., To K.K.-W., Yuen K.-Y. Triple combination of interferon beta-1b, lopinavir-ritonavir, and ribavirin in the treatment of patients admitted to hospital with COVID-19: an open-label, randomised, phase 2 trial. *Lancet*, 2020, Vol. 395, no. 10238, pp. 1695–1704.
12. Li Q., Wang J., Tang Y., Lu H. Next-generation COVID-19 vaccines: Opportunities for vaccine development and challenges in tackling COVID-19. *Drug. Discov. Ther.*, 2021, Vol. 15, no. 3, pp. 118–123.
13. Lokugamage K.G., Hage A., de Vries M., Valero-Jimenez A.M., Schindewolf C., Dittmann M., Rajsbaum R., Menachery V.D. Type I interferon susceptibility distinguishes SARS-CoV-2 from SARS-CoV. *J. Virol.*, 2020, Vol. 94, no. 23, pp. 1410–1420.
14. Park A., Iwasaki A. Type I and type III interferons - induction, signaling, evasion, and application to combat COVID-19. *Cell Host Microbe*, 2020, Vol. 27, no. 6, pp. 870–878.
15. Randolph H.E., Barreiro L.B. Herd immunity: understanding COVID-19. *Immunity*, 2020, Vol. 52, no. 5, pp. 737–741.
16. Thoms M., Buschauer R., Ameismeier M., Koepke L., Denk T., Hirschenberger M., Kratzat H., Hayn M., Mackens-Kiani T., Cheng J., Straub J.H., Stürzel C.M., Fröhlich T., Berninghausen O., Becker T., Kirchhoff F., Sparrer K.M.J., Beckmann R. Structural basis for translational shutdown and immune evasion by the Nsp1 protein of SARS-CoV-2. *Science*, 2020, Vol. 369, no. 6508, pp. 1249–1255.
17. Wang N., Zhan Y., Zhu L., Hou Z., Liu F., Song P., Qiu F., Wang X., Zou X., Wan D., Qian X., Wang S., Guo Y., Yu H., Cui M., Tong G., Xu Y., Zheng Z., Lu Y., Hong P. Retrospective multicenter cohort study shows early interferon therapy is associated with favorable clinical responses in COVID-19 patients. *Cell Host Microbe*, 2020, Vol. 28, no. 3, pp. 455–464.

Авторы:

Савин Т.В. — врач — аллерголог-иммунолог ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека; старший лаборант кафедры иммунологии ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Тюрин Т.О. — студентка 6-го курса ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Миличкина А.М. — к.м.н., главный врач ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Санкт-Петербург, Россия

Дрозд И.В. — к.б.н., заведующая Центральной клинико-диагностической лабораторией (ЦКДЛ) ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Санкт-Петербург, Россия

Кузнецова Р.Н. — к.м.н., врач — аллерголог-иммунолог ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека; доцент кафедры иммунологии ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Симбирцев А.С. — д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека; профессор кафедры иммунологии ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Тотolian Арег А. — д.м.н., профессор, академик РАН, заведующий лабораторией молекулярной иммунологии, директор ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера»; заведующий кафедрой иммунологии ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Authors:

Savin T.V., Allergologist-Immunologist, Saint Petersburg Pasteur Institute; Senior Laboratory Assistant, Department of Immunology, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Tyurina T.O., Student, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Milichkina A.M., PhD (Medicine), Head Physician, Saint Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation

Drozhd I.V., PhD (Biology), Head, Central Clinical Diagnostic Laboratory, Saint Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation

Kuznetsova R.N., PhD (Medicine), Allergologist-Immunologist, Saint Petersburg Pasteur Institute; Associate Professor, Department of Immunology, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Simbirtsev A.S., PhD, MD (Medicine), Professor, Corresponding Member, Russian Academy of Sciences, Leading Research Associate, Laboratory of Molecular Immunology, Saint Petersburg Pasteur Institute; Professor, Department of Immunology, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Totolian Areg A., PhD, MD (Medicine), Professor, Full Member, Russian Academy of Sciences, Head, Laboratory of Molecular Immunology, Director, Saint Petersburg Pasteur Institute; Head, Department of Immunology, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Аак О.В.	547	Коваленко С.Н.	587	Рябова Л.В.	619, 641
Абдуллаева Л.М.	491	Козенков И.И.	501	Савин Т.В.	705
Абрамова Н.Д.	603, 657	Козлова Я.И.	547, 553	Сайтгалина М.А.	611
Авагян А.С.	485	Козлов В.А.	515, 527, 533	Самойликов Р.В.	457
Алексеева А.С.	593	Коробова З.Р.	611	Санацкий К.Р.	567
Ангельская О.А.	515	Коровкина Е.С.	657	Сарапульцев А.П.	641
Антипова Е.П.	599	Костинов М.П.	603, 627, 633, 657	Саркисян Н.Г.	463
Арсентьева Н.Е.	611	Крюкова Н.О.	633, 657	Сарычев В.А.	507
Астраханцева И.В.	665	Кудрявцев И.В.	587	Сафронова Э.А.	619
Атажахова М.Г.	647	Кузнецова Р.Н.	587, 705	Свитич О.А.	457, 485, 603, 633, 657
Багишева Н.В.	599	Куликов А.Н.	611	Сенникова С.В.	477
Балацкая Н.В.	485	Купцова Д.Г.	491	Серебрякова М.К.	587
Баранова И.А.	633, 657	Курбатова О.В.	491	Сизиков А.Э.	527
Барова Н.К.	671, 679, 689	Лактионова М.Н.	627	Силаев А.А.	573
Башнина Е.Б.	553	Лигатюк Д.Д.	443	Симбирцев А.С.	705
Блинова Е.А.	515	Литвинова Л.С.	443	Соболев А.В.	547
Боева О.С.	527	Лобанова В.В.	501	Соловьева И.Л.	627
Борисевич В.И.	527	Ломтатидзе Л.В.	697	Станевич О.В.	611
Борода А.В.	507	Любимова Н.Е.	611	Сташкевич Д.С.	521
Бочкова М.С.	449	Лягуша Д.Э.	671	Стрельцова В.В.	599
Бурмистрова А.Л.	593	Малашенко В.В.	443	Сулова Т.А.	521
Быков А.С.	457	Маркелова Е.В.	567, 573	Тараканов В.А.	671, 679, 689
Валикова О.В.	507	Мархайчук А.З.	541	Татаркина М.А.	501
Васильева Н.В.	547, 553	Матушкина В.А.	647	Татевосов В.Р.	657
Васильев Н.Ю.	547	Машилов К.В.	627, 657	Тетерин Ю.В.	579, 671, 679, 689
Вольский Н.Н.	533	Мелашенко О.Б.	443	Тимганова В.П.	449
Воробьев С.В.	587	Меремьянина Е.А.	603	Тихонов Я.Н.	507
Воропаева Е.А.	477	Миличкина А.М.	705	Топтыгина А.П.	477
Гаврилова Е.Д.	533	Митропанова М.Н.	579	Тотоян Арег А.	611, 705
Гаврилова Т.В.	485	Мовсисян Г.Б.	491	Тузанкина И.А.	463
Гайнитдинова В.В.	657	Моисеева М.В.	599	Тюрина Т.О.	705
Гоголева В.С.	437	Монашенко Д.Н.	587	Усанина Д.И.	449
Гойман Е.В.	533	Мордык А.В.	599	Уткин В.А.	627
Гончаров А.Г.	501, 541	Мун А.Ч.	541	Учеваткина А.Е.	547, 553
Греченко В.В.	603	Мурашкин Н.Н.	491	Филиппова Л.В.	547, 553
Гриценко В.А.	471	Мухаметзянова В.Г.	559	Филиппова Ю.Ю.	593
Гунбин К.В.	501	Недоспасов С.А.	437	Фисенко А.П.	491
Девальд И.В.	521	Нестерова И.В.	647, 671, 679, 689, 697	Фисенко В.Г.	573
Демина Д.В.	527, 533	Норка А.О.	587	Фролова Е.В.	547, 553
Демченко Е.Н.	533	Норкин И.К.	443	Хазиахматова О.Г.	443
Джигкаев А.Х.	501	Осипцов В.Н.	657	Хасанова А.А.	633
Добрынина М.А.	641	Останкова Ю.В.	611	Хисамутдинова Д.Р.	553
Дрозд И.В.	705	Пальченко П.М.	559	Хлусов И.А.	443
Дроздова Л.И.	463	Пашинина О.А.	471	Хлыстова К.А.	463
Друцкая М.С.	437	Пашкина Е.А.	527	Храпунова И.А.	627
Ермолицкая М.З.	567, 573	Пашкова Т.М.	471	Хромова Е.А.	657
Заморина С.А.	449	Пашков Е.А.	457	Чапурин В.Н.	579, 647, 671, 679, 689
Зверев В.В.	457	Пашков Е.П.	457	Чепурнова Н.С.	567
Здор В.В.	507	Певцов Д.Э.	611	Черных Е.И.	611
Зенина А.А.	573	Петричук С.В.	491	Чжан Чэнь	627
Зурочка А.В.	619, 641	Петрунина С.Ю.	559	Чичерев Е.А.	679, 689
Зурочка В.А.	641	Печеник А.С.	627	Чудилова Г.А.	579, 647, 671, 679, 689, 697
Иванов П.А.	443	Пиктурно С.Н.	697	Чумаков Н.С.	463
Калюжная Н.О.	603	Плешкова А.О.	541	Чумачёва Ю.В.	521
Карташова О.Л.	471	Поддубиков А.В.	457, 603	Чучалин А.Г.	633, 657
Катаева Н.Н.	463	Пономаренко Т.А.	579	Шардина К.Ю.	449
Кашенко В.А.	611	Потапов А.С.	491	Шуматов В.Б.	573
Кинкулькина А.Р.	485	Пряников Г.А.	457	Юрова К.А.	443
Кныш С.В.	567	Радыгина Т.В.	491	Ющенко А.Н.	567
Ковалева С.В.	647, 671, 697	Рыбакова О.Г.	559	Ющук В.Н.	567

агонист гонадотропин-рилизинг гормона.....	553	исход лечения.....	599	рецептор IL-7.....	516
аллергические заболевания.....	527	ишемическая болезнь сердца.....	574	РНК-интерференция.....	457
аллергический ринит.....	542	капиллярная кровь.....	478	секреторный иммуноглобулин А.....	634
аллергический энтероколит.....	559	клеточный иммунный ответ.....	553	секрет предстательной железы.....	471
аллергопатология.....	542	клинико-иммунологическая		сенсibilизация к пищевым	
антигенстимулирующая		эффективность.....	680	аллергенам.....	559
субпопуляция.....	690	коронавирус.....	665	синдром поликистозных яичников... 508	
антииммуноглобулиновая		коронавирус SARS-CoV-2.....	705	синдром хронической усталости.....	648
активность.....	471	коронавирусная инфекция.....	599	система протеолиза.....	568
антитела.....	665	лабораторная диагностика.....	612	стенотирование коронарных артерий... 620	
аортокоронарное шунтирование.....	574	лейкоциты.....	593	стероидный остеопороз.....	463
артериальная гипертензия.....	568, 599	лимфотоксин.....	437	структура.....	542
аутоиммунные заболевания.....	492, 527	лимфоциты.....	620	субпопуляции.....	648
аутоиммунные тиреопатии.....	508	матриксные металлопротеиназы.....	568	субпопуляции лимфоцитов.....	478, 588
аутоиммунный гепатит.....	492	метаболизм лимфоцитов.....	492	сукцинатдегидрогеназа.....	492
бактериальная персистенция.....	471	миелоидные супрессорные клетки.....	450	тромбоциты.....	628
бактериальные вакцины.....	658	микогенная сенсibilизация.....	547	узловой эутиреоидный зоб.....	508
бактерии.....	471	микробиота.....	478	фенотип.....	690, 698
башкирская популяция.....	522	миРНК.....	457	холестерин.....	568
блокада α -цепи рецептора IL-7.....	516	митохондриальная дисфункция.....	502	хронические воспалительные	
бронхиальная астма.....	527, 534, 47	ММСК.....	443	заболевания органов малого таза.....	698
вакцинация.....	665, 705	моноклеарные клетки крови.....	443	хронический бактериальный	
вакцинированные.....	628	мукозальный иммунитет.....	634, 658	простатит.....	471
витамин D3.....	463	мультиплексный анализ.....	443	хронический пародонтит.....	463
внеклеточная ДНК.....	534	мышинные модели.....	437	циткиновый шторм.....	604
возраст.....	568	неиммунизированные.....	628	циткины.....	437, 457, 478, 508, 593
воспаление.....	502, 534, 588	нейродегенерация.....	486	челюстно-лицевая область.....	580
воспалительные заболевания		нейтрализующие антитела.....	665	черепно-мозговая травма.....	588
кишечника.....	492	нейтрофилы.....	642	экзема.....	478
врожденный иммунитет.....	486	нейтрофильные гранулоциты.....	648, 690, 698	экспрессия.....	593, 604
гексапептид.....	672, 680, 698	неклассические молекулы главного		экспрессия генов.....	457
герпесвирусные инфекции.....	648	комплекса гистосовместимости.....	527	эозинофилия периферической	
глаукома.....	486	новая коронавирусная инфекция.....	628	крови.....	559
глицерогидрогель кремния.....	463	ожирение.....	508	эозинофилы.....	547
гноино-воспалительные		оксидативный стресс.....	502	3D-матрикс.....	443
заболевания.....	580	остеоартрит.....	502	<i>Alternaria</i> spp.....	547
гонадотропин-зависимое		остеопротегерин.....	522	<i>Aspergillus</i> spp.....	547
преждевременное половое развитие... 553		острая деструктивная пневмония.....	672	V1-лимфоциты.....	620
грипп.....	457	острое почечное повреждение.....	574	C-реактивный белок.....	599
гуморальный иммунитет.....	634	острый коронарный синдром.....	620	CD14 ⁺ клетки.....	450
гуморальный иммунный ответ.....	553	острый остеомиелит.....	680, 690	COVID-19.....	612, 620, 628, 634, 658
дифференцировка моноцитов.....	450	пандемия.....	705	D-димер.....	628
дети.....	492, 559, 580, 593, 672, 680, 690	патогенез.....	508	EAE.....	437
дефекты иммунной системы.....	672	пептид активного центра ГМ-КСФ ..642		IFN α	457
дисфункции.....	580	периостин.....	547	IFN γ	457
дисфункции иммунной системы.....	680	пищевая аллергия.....	559	IL-1 β	604
дифференцировка MDSC <i>in vitro</i>	450	полиморфизм.....	522	IL-6.....	599
заболевание COVID-19.....	604	полиморфизм гена		IL-10.....	457
иммунитет.....	705	остеопротегерина.....	522	IL-18.....	604
иммунная дисфункция.....	593	полиморфизм генов.....	486	<i>in vitro</i>	443
иммунная система.....	580, 620, 642	постковидные пациенты.....	642	KREC.....	612
иммунный ответ.....	665	постковидный синдром.....	648	LT β R.....	437
«Иммуовак-ВП-4».....	658	практически здоровые женщины.....	568	NF- κ B.....	492
иммуноглобулин G.....	634	провоспалительные цитокины.....	534	OPG.....	522
иммунокомпрометированность... 672, 698		прогностические маркеры.....	612	SARS-CoV-2.....	612, 634
иммунокоррекция.....	658	проточная цитометрия.....	492	SARS-CoV-2-инфекция.....	642
иммунометаболизм.....	492	проточная цитометрия		sIgA.....	658
иммуномодулирующая терапия... 672, 680		с визуализацией.....	492	sIgA-протеазная активность.....	471
иммуностарение.....	502	проточная цитофлуометрия.....	588	T-клетки.....	642
иммуносупрессия.....	450	псориаз.....	478, 492	T-лимфоциты.....	642
иммунотерапия.....	698	псориазический артрит.....	516	TGF- β 1.....	574
иммуотропные пептиды.....	463	ПЦР.....	443	TGF- β 2.....	574
иммунофенотипирование.....	588	распространенность.....	542	TGF- β 3.....	574
индекс позитивности.....	705	рассеянный склероз.....	437, 492	Th1-лимфоциты.....	516
интерлейкины.....	604	расстройства аутистического		Th1/Th2-баланс.....	534
интерферон.....	705	спектра.....	593	Th17-лимфоциты.....	516
инфекционные осложнения.....	542	ревакцинация.....	665	TNFRSF11B.....	522
инфламмосома.....	486	ревматоидный артрит.....	522, 527	TNF α	457, 604
исход заболевания.....	612	регуляторные T-лимфоциты.....	588	TREC.....	612
		рекомбинантный IFN α 2b.....	648, 690		