

СПОНТАННЫЙ И ИНДУЦИРОВАННЫЙ АПОПТОЗ МОНОНУКЛЕАРОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ В ПАТОГЕНЕЗЕ САХАРНОГО ДИАБЕТА 1 ТИПА

**Луговая А.В.¹, Калинина Н.М.^{1,2}, Митрейкин В.Ф.¹, Эмануэль Ю.В.¹,
Ковальчук Ю.П.¹, Артемова А.В.¹**

¹ ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

² ФГБУ «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А.М. Никифорова» МЧС России Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Апоптоз является ведущим механизмом деструкции β -клеток поджелудочной железы при сахарном диабете 1 типа (СД-1). При исследованиях маркеров апоптоза мононуклеаров периферической крови с целью уточнения роли программируемой клеточной смерти в патогенезе различных заболеваний более значимой считается оценка активационного апоптоза в ответ на стимуляцию митогеном или специфическим антигеном, так как роль апоптоза в иммунном ответе возрастает в условиях активации клеток. Установлено, что стимулы, которые активируют покоящиеся Т-лимфоциты, инициируют апоптотическую гибель активированных Т-лимфоцитов. Поэтому определение только спонтанного апоптоза мало информативно. Кроме того, определение чувствительности клеток к индукции апоптоза дает возможность выявить связь патологического процесса с усилением или ослаблением этой чувствительности. Ключевым моментом в инициации СД-1 является устойчивость к апоптозу активированных аутореактивных Т-лимфоцитов, которые мигрируют из кровяного русла в поджелудочную железу и принимают активное участие в деструкции инсулярного аппарата поджелудочной железы. Несмотря на длительное изучение патогенеза СД-1, точные причины резистентности клонов эффекторных Т-клеток к апоптозу остаются неясными. Не установлены факты, дающие ответ на вопрос: насколько способность Т-лимфоцитов периферической крови вступать в апоптоз ассоциирована с тяжестью и продолжительностью заболевания. В связи с этим целью исследования явилась оценка эффективности активационного апоптоза лимфоцитов периферической крови больных СД-1 в зависимости от состояния компенсации и длительности течения заболевания. Были изучены особенности индукции активационного апоптоза в культуре мононуклеаров периферической крови у больных сахарным диабетом 1 типа. В качестве индукторов были использованы фитогемоглютинин (ФГА) и инсулин. Выявлена повышенная чувствительность мононуклеаров периферической крови больных СД-1 к активационному апоптозу *in vitro*. Максимальный апоптотический ответ на ФГА был отмечен при декомпенсации СД-1. Принимая во внимание, что в ответ на стимуляцию ФГА апоптозу подвергаются преимущественно Т-клетки, можно говорить о высокой чувствительно-

Адрес для переписки:

Луговая Анна Владимировна
ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский
государственный медицинский университет имени
академика И.П. Павлова» Министерства
здравоохранения РФ
197022, Россия, Санкт-Петербург, ул. Л. Толстого,
6-8, корп. 11.
Тел.: 8 (921) 315-97-48.
E-mail: g89213159748@gmail.com

Address for correspondence:

Lugovaya Anna V.
First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University
197022, Russian Federation, St. Petersburg, L. Tolstoy str.,
6-8, bldg 11.
Phone: 7 (921) 315-97-48.
E-mail: g89213159748@gmail.com

Образец цитирования:

А.В. Луговая, Н.М. Калинина, В.Ф. Митрейкин,
Ю.В. Эмануэль, Ю.П. Ковальчук, А.В. Артемова
«Спонтанный и индуцированный апоптоз
мононуклеаров периферической крови в патогенезе
сахарного диабета 1 типа» // Медицинская
иммунология, 2020. Т. 22, № 1. С. 123-134.
doi: 10.15789/1563-0625-SAA-1834

© Луговая А.В. и соавт., 2020

For citation:

A.V. Lugovaya, N.M. Kalinina, V.Ph. Mitreikin,
Yu.V. Emanuel, Yu.P. Kovalchuk, A.V. Artyomova
“Spontaneous and activation-induced apoptosis of peripheral
blood mononuclear cells in the pathogenesis of type 1 diabetes
mellitus”, *Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya
Immunologiya*, 2020, Vol. 22, no. 1, pp. 123-134.
doi: 10.15789/1563-0625-SAA-1834

DOI: 10.15789/1563-0625-SAA-1834

сти активированных Т-лимфоцитов больных СД-1 к индукции апоптоза. Самый высокий уровень активационного апоптоза в ответ на стимуляцию инсулином был выявлен при компенсации СД-1. Установлено, что интенсивность спонтанного и индуцированного апоптоза мононуклеаров периферической крови больных СД-1 коррелирует с состоянием декомпенсации углеводного обмена и степенью нарушения секреторной функции β -клеток поджелудочной железы. Это подтверждается наличием выраженной прямой корреляционной связи между процентом гиподиплоидных клеток и концентрацией глюкозы в крови и обратной зависимостью между количеством апоптотических клеток и содержанием С-пептида в сыворотке крови. Полученные данные находятся в соответствии с современной концепцией иммунопатогенеза СД-1, согласно которой развитие аутоиммунных заболеваний связано не только с усиленным апоптозом клеток-мишеней, но и с дефектом фагоцитарного клиренса апоптотических клеток вследствие нарушения эффероцитоза – фагоцитоза апоптотических клеток. Таким образом, максимальное повышение уровня спонтанного и индуцированного апоптоза лимфоцитов периферической крови при декомпенсации СД-1 объясняется не только влиянием гипергликемии, но и вторичным иммунным ответом на так называемые «поздние апоптотические» или «вторичные некротические» β -клетки вследствие их неэффективного фагоцитарного клиренса.

Ключевые слова: апоптоз, Т-лимфоциты, фитогемагглютинин, инсулин, сахарный диабет 1 типа, С-пептид, β -клетки

SPONTANEOUS AND ACTIVATION-INDUCED APOPTOSIS OF PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELLS IN THE PATHOGENESIS OF TYPE 1 DIABETES MELLITUS

Lugovaya A.V.^a, Kalinina N.M.^{a,b}, Mitreikin V.Ph.^a, Emanuel Yu.V.^a, Kovalchuk Yu.P.^a, Artyomova A.V.^a

^a First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

^b A. Nikiforov Russian Center of Emergency and Radiation Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. Apoptosis is the leading mechanism of pancreatic β -cell destruction in type 1 diabetes mellitus (T1DM). Assessment of activation apoptosis in response to stimulation with mitogen or a specific antigen is considered more significant when studying apoptosis markers in peripheral blood mononuclear cells to clarify the role of programmed cell death in pathogenesis of various diseases, since the role of apoptosis in immune response is increased in activated cells. It has been established that the stimuli that activate resting T lymphocytes initiate apoptotic death of activated T lymphocytes. Therefore, detection of spontaneous apoptosis only is not very informative. In addition, determination of cell sensitivity to apoptosis induction makes it possible to identify relations of pathological process to the enhancement or weakening of this sensitivity. The key point in the T1DM initiation is apoptosis resistance of activated autoreactive T lymphocytes, that migrate from bloodstream to the pancreas and take an active part in destruction of the pancreatic insular structures. Despite long studies of T1DM pathogenesis, the exact causes of resistance of effector T cell clones to apoptosis remain unclear. There are no facts that answer the question: to what extent is the ability of T lymphocytes of peripheral blood to enter into apoptosis associated with severity and duration of the disease. In this regard, the aim of the study was to evaluate the effectiveness of *in vitro* activation-induced apoptosis of T lymphocytes in the patients with T1DM, depending on the state of compensation and duration of the disease. The features of activation-induced apoptosis have been studied in cultures of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) in the patients with T1DM. Phytohemagglutinin (PHA) and insulin were used as apoptosis inducers. Increased *in vitro* sensitivity of PBMC to activation-induced apoptosis was revealed in T1DM patients. The strongest apoptotic response to PHA was detected in cases of T1DM decompensation. Considering predominantly T cells to undergo apoptosis in response to PHA stimulation, one may speak about high sensitivity of activated T lymphocytes to induced apoptosis in the patients with T1DM. The highest level of activation-induced apoptosis in response to insulin stimulation was revealed in the compensation phase of T1DM. We have found that the intensity of spontaneous and activation-induced apoptosis correlates with decompensation of the disease and the degree of β -cells secretory function disorder. In fact, strong direct correlation was observed between the percentage

of hypodiploid cells and blood concentration of glucose, and the inverse correlation was shown between the number of apoptotic cells and serum levels of C-peptide. The data obtained are in accordance with the modern concept of T1DM immunopathogenesis, which includes a development of autoimmune diseases associated not only with enhanced apoptosis of target cells, but also with a defect in phagocytic clearance of apoptotic cells due to impaired efferocytosis, i.e., phagocytosis of apoptotic cells. Thus, the maximal increase in spontaneous and activation-induced apoptosis levels of peripheral blood lymphocytes during the DM-1 decompensation is explained not only by the hyperglycemia effects, but also by the secondary immune response to the so-called “late apoptotic” or “secondary necrotic” β -cells, due to their ineffective phagocytic clearance.

Keywords: apoptosis, T lymphocytes, phytohaemagglutinin, insulin, type 1 diabetes mellitus, C-peptide, β -cell

Введение

В патогенезе сахарного диабета 1 типа (СД-1) с апоптозом связаны 2 основных механизма: 1) нарушение процессов апоптоза в тимусе, приводящее к неэффективной селекции аутореактивных Т-лимфоцитов; 2) роль апоптоза как завершающего механизма иммунообусловленной деструкции β -клеток. Аутореактивные лимфоциты, устойчивые к апоптозу, мигрируют из кровяного русла в орган-мишень – поджелудочную железу и образуют воспалительные инфильтраты – инсулиты [26, 29]. Иммунокомпетентные клетки, инфильтрирующие островковую ткань, продуцируют провоспалительные цитокины (фактор некроза опухоли α (TNF α), интерферон- γ (IFN γ) и интерлейкин-1 β (IL-1 β)), индуцибельную NO-синтазу (iNOS) с последующим образованием оксида азота (NO), избыточное количество свободных радикалов и другие соединения, вызывающие гибель β -клеток по механизму апоптоза [15, 26, 31]. Активированные цитотоксические Т-лимфоциты (ЦТЛ), входящие в состав инсулитов, осуществляют выброс цитотоксических гранул: перфорина, гранзимы А и гранзимы В, которые представляют собой сериновые протеазы [30]. Перфорин доставляет гранзимы в клетку-мишень, где они активируют различные виды программированной клеточной смерти (ПКС): апоптоз, некроптоз или некроз (при истощении клеточной АТФ) [16, 19, 24, 30, 32]. Гранзим А индуцирует каспазозависимый апоптоз клетки-мишени. Гранзим В, напротив, инициирует каспазозависимый механизм апоптоза, активируя расщепление эффекторных каспаз (каспаза-3, -6, -7) и их субстратов, в том числе PARP-1 (Poly ADP-Ribose Polymerase 1 – поли(АДФ-рибоза) полимеразы 1, которая является ранним сенсором повреждения ДНК [8, 13, 16, 18]. Новейшие экспериментальные исследования показали, что при моделировании Th1-опосредованного аутоиммунного диабета у мышей основная часть трансплантированных им β -клеток погибает в результате некроза, индуцированного аутореактивными Т-клетками. Вклад апоптоза и некроптоза в гибель островкового аппарата при оттор-

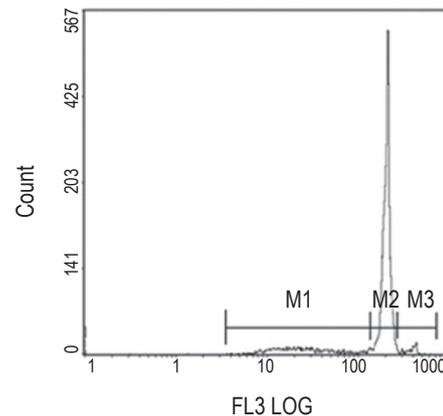


Рисунок 1. ДНК-гистограмма, полученная при цитометрическом анализе культуры мононуклеаров периферической крови здорового человека

Примечание. M1 – зона расположения гиподиплоидных клеток; M2 – зона расположения диплоидных клеток; M3 – зона расположения тетраплоидных клеток.

Figure 1. DNA histogram obtained by cytometric analysis of the culture of peripheral blood mononuclear cells of a healthy person

Note. M1, the area of hypodiploid cells; M2, the area of diploid cells; M3, the area of tetraploid cells.

жении трансплантата оказался ничтожным [34]. В то же время последние исследования, проведенные на клеточной линии островков поджелудочной железы человека EndoC- β H1, доказывают ключевую роль апоптоза в гибели островков Лангерганса [21]. В настоящий момент большинство авторов считают апоптоз ведущим механизмом деструкции инсулярного аппарата поджелудочной железы [10, 17, 21, 25].

При клинико-иммунологических обследованиях пациентов более значимой считается оценка активационного апоптоза в ответ на стимуляцию митогеном или специфическим антигеном, так как роль апоптоза в иммунном ответе возрастает в условиях активации клеток, когда он выступает в качестве процесса, альтернативного пролиферации [3, 4, 9]. Определение чувствительности клеток к индукции апоптоза дает возможность выявить связь патологического процесса с усилением или ослаблением этой чувствительности [4,

9]. Для определения готовности Т-лимфоцитов к активационному апоптозу в качестве индуктора используют фитогемагглютинин (ФГА), так как он является преимущественно Т-клеточным митогеном и дает возможность судить об апоптотической активности именно Т-клеток [4, 9]. В наших предыдущих исследованиях мы показали значение атерогенных липопротеинов как «эндогенных» индукторов апоптоза у больных острым коронарным синдромом (ОКС) [1, 2, 7]. Нами было установлено, что окисленные липопротеины низкой плотности индуцируют Fas-опосредованный апоптоз как мононуклеаров периферической крови, так и эндотелиоцитов коронарных сосудов, что свидетельствует о системном характере апоптоза при ОКС [1, 7]. Усиление апоптоза эндотелия приводило к поступлению в кровь значительного количества микровезикул эндотелиального происхождения и увеличению прокоагулянтной активности крови за счет экспрессии на их поверхности фосфатидилсерина, что говорит о существенной роли апоптоза эндотелиоцитов в патогенезе тромбофлебии при атеросклерозе [2, 7]. Это подтверждает актуальность исследований роли индукторов апоптоза в пато-

генезе не только сахарного диабета, но и диабетических микро- и макроангиопатий [22, 33].

Ключевым моментом в инициации СД-1 является устойчивость к апоптозу активированных аутореактивных Т-лимфоцитов, которые мигрируют из кровяного русла в поджелудочную железу и принимают активное участие в деструкции β-клеток. Несмотря на длительное изучение патогенеза СД-1, точные причины резистентности клонов эффекторных Т-клеток к апоптозу остаются неясными. Не установлены факты, дающие ответ на вопрос: насколько способность Т-лимфоцитов периферической крови вступать в апоптоз ассоциирована с тяжестью и продолжительностью заболевания. В связи с этим представляется актуальной оценка эффективности активационного апоптоза Т-лимфоцитов *in vitro* у больных СД-1 в зависимости от состояния компенсации и длительности течения заболевания.

Цель исследования – определить чувствительность мононуклеаров периферической крови больных СД-1 к активационному апоптозу в ответ на стимуляцию ФГА и инсулином через 144 часа культивирования *in vitro* и сопоставить с уровнем глюкозы и С-пептида в крови.

ТАБЛИЦА 1. СОДЕРЖАНИЕ С-ПЕПТИДА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ БОЛЬНЫХ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ 1 ТИПА (СД-1)

TABLE 1. SERUM LEVEL OF C-PEPTIDE IN PATIENTS WITH TYPE 1 DIABETES MELLITUS (T1DM)

Группы обследуемых лиц Groups of examined persons	Характеристика обследуемых лиц Characteristics of the examined persons	Число обследуемых лиц Number of examined persons (n)	С-пептид (нг/мл) C-peptide (ng/ml)
I группа I group	Здоровые лица Healthy persons	n = 30	2,0
IIa группа IIa group	Состояние декомпенсации, впервые выявленный СД-1 The state of decompensation, newly diagnosed T1DM	n = 17	0,24**
IIб группа IIb group	Состояние декомпенсации, средняя продолжительность СД-1 составляет 15,3±5,1 года The state of decompensation, the average duration of the T1DM is 15.3±5.1 years	n = 19	0,05***
IIIa группа IIIa group	Состояние компенсации, средняя продолжительность СД-1 составляет 0,6±0,2 года The state of compensation, the average duration of the T1DM is 0.6±0.2 years	n = 13	0,49**
IIIб группа IIIb group	Состояние компенсации, средняя продолжительность СД-1 составляет 15,1±5,4 года The state of compensation, the average duration of the T1DM is 15.1±5.4 years	n = 14	0,08***

Примечание. ** – различия по изучаемому показателю с контрольной группой статистически достоверны (p < 0,01); *** – различия по изучаемому показателю с контрольной группой статистически достоверны (p < 0,001).

Note. **, differences in the studied indicator with the control group are statistically significant (p < 0.01); ***, differences in the studied indicator with the control group are statistically significant (p < 0.001).

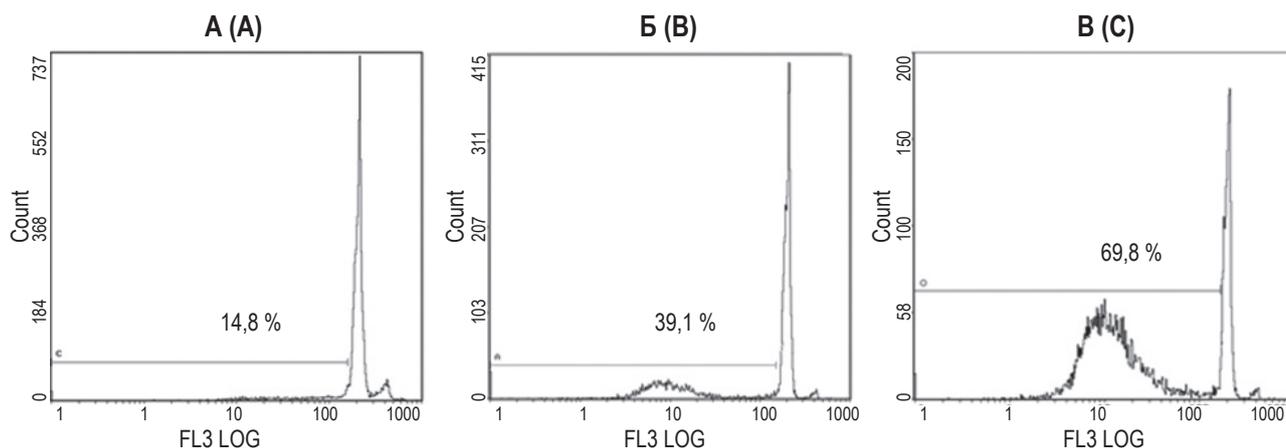


Рисунок 2. Гистограммы, иллюстрирующие количество (%) гиподиплоидных клеток в культуре мононуклеаров периферической крови в ответ на стимуляцию ФГА через 144 часа культивирования в контрольной группе (А), в группе больных сахарным диабетом 1 типа (СД-1) в состоянии компенсации углеводного обмена (Б), в группе больных СД-1 в состоянии декомпенсации углеводного обмена (В)

Figure 2. Histograms illustrating the number (%) of hypodiploid cells in the culture of peripheral blood mononuclear cells in response to stimulation of PHA after 144 hours of cultivation in the control group (A), in the group of patients with type 1 diabetes mellitus (T1DM) in the state of compensation of carbohydrate metabolism (B), in the group patients with T1DM in a state of decompensation of carbohydrate metabolism (C)

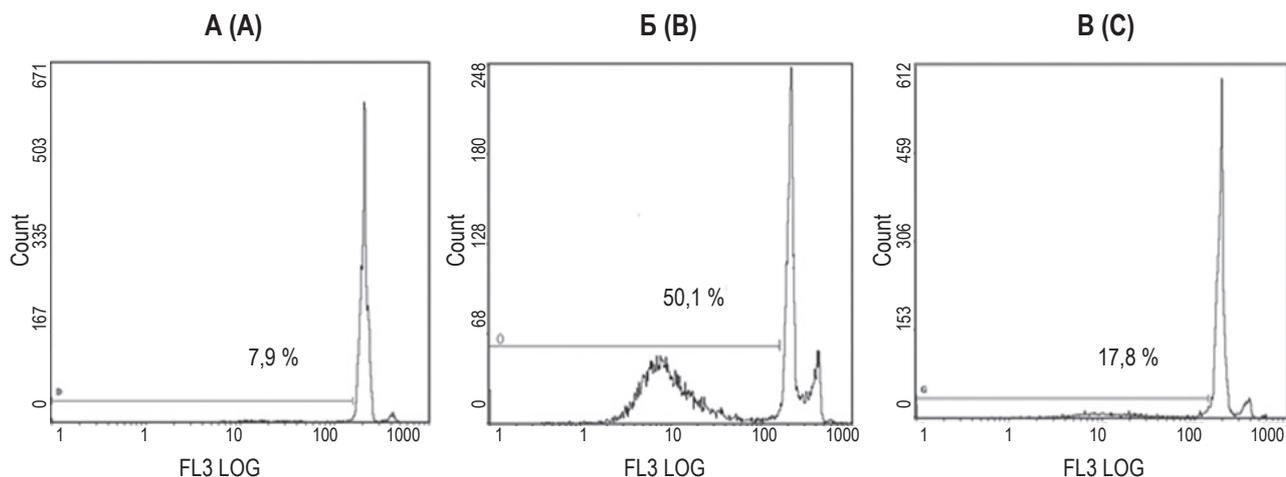


Рисунок 3. Гистограммы, иллюстрирующие количество (%) гиподиплоидных клеток в культуре мононуклеаров периферической крови в ответ на стимуляцию инсулином через 144 часа культивирования в контрольной группе (А), в группе больных сахарным диабетом 1 типа (СД-1) в состоянии компенсации углеводного обмена (Б), в группе больных СД-1 в состоянии декомпенсации углеводного обмена (В)

Figure 3. Histograms illustrating the number (%) of hypodiploid cells in the culture of peripheral blood mononuclear cells in response to stimulation of insulin after 144 hours of cultivation in the control group (A), in the group of patients with type 1 diabetes mellitus (T1DM) in the state of compensation of carbohydrate metabolism (B), in the group patients with T1DM in a state of decompensation of carbohydrate metabolism (C)

Материалы и методы

Характеристика обследуемых групп больных

Было обследовано 63 больных с достоверно установленным диагнозом «СД-1». Контрольную группу (I группа) составили 30 здоровых лиц, по полу и возрасту сопоставимых с больными СД-1. Распределение больных по группам про-

водилось в зависимости от состояния компенсации углеводного обмена и длительности течения заболевания. II группу (декомпенсированный СД-1) составили 17 больных с впервые выявленным СД-1 (IIa группа) и 19 пациентов с длительностью течения СД-1 в среднем $15,3 \pm 5,1$ года (IIб группа). На момент постановки диагноза концентрация глюкозы в крови у пациентов груп-

пы Па составила в среднем $16,3 \pm 2,2$ ммоль/л. В группе Пб уровень гипергликемии составил в среднем $17,1 \pm 1,5$ ммоль/л. В III группу (состояние компенсации СД-1) были включены 13 больных с длительностью заболевания до 1 года, средняя продолжительность заболевания которых составила $0,6 \pm 0,2$ года (IIIа группа), и 14 человек с продолжительностью СД-1 в среднем $15,1 \pm 5,4$ года (IIIб группа). На момент исследования уровень глюкозы в группах IIIа и IIIб составил в среднем $3,9 \pm 1,9$ ммоль/л и $4,1 \pm 1,6$ ммоль/л соответственно.

Определение процента гиподиплоидных клеток

Об уровне спонтанного и индуцированного апоптоза судили по процентному содержанию гиподиплоидных клеток, выявляемых методом проточной ДНК-цитометрии. Гиподиплоидия является следствием утраты в процессе апоптоза части хроматина [4, 6, 12]. В основе метода лежит взаимодействие красителя этидиум бромида с ДНК апоптотических клеток, после чего исследуемые образцы подвергают проточной цитометрии. Процент клеток во фракции, соответствующей гиподиплоидному содержанию ДНК, характеризует апоптотические процессы [12]. Фракция апоптотических клеток (M1) располагается левее основного пика (M2), соответствующего диплоидным клеткам на гистограмме (рис. 1).

Для активации мононуклеаров использовали ФГА в конечной концентрации 10 мкг/мл и человеческий рекомбинантный инсулин («Моно-тард НМ», Ново Нордиск, Дания) в трех различных концентрациях: 1,75 мкг/мл, 3,5 мкг/мл и 7,0 мкг/мл. Концентрация инсулина 3,5 мкг/мл была утверждена как оптимальная в результате серии начальных экспериментов. Для изучения спонтанного апоптоза использовали клеточные культуры без добавления индукторов. Оценка апоптоза осуществляли сразу после выделения клеток (спонтанный апоптоз), а также через 24, 72 и 144 ч культивирования в CO_2 -инкубаторе. Сроки инкубации были выбраны в соответствии с литературными данными [5, 9, 29], согласно которым у здоровых лиц апоптотический ответ на стимуляцию ФГА достигает своего максимума на 6-7 сутки.

Проточная ДНК-цитометрия

По окончании инкубации в анализируемые образцы добавляли 10 мкл РНК-азы, 8 мкл раствора этидиума бромида (1 мг/мл) и анализировали на проточном цитометре EPICS XL (Beckman Coulter, США). Анализ ДНК-гистограмм проводили в программе Multigraph (Beckman Coulter), с помощью которой осуществляли подсчет процента гиподиплоидных клеток.

Оценка секреторной функции β -клеток

Количественное определение С-пептида в сыворотке крови проводили методом твердофазного

иммуноферментного анализа с использованием тест-системы, производимой фирмой Diagnostic System Laboratories (США).

Статистический анализ результатов

Для статистической обработки полученных данных использовали непараметрический критерий Вилкоксона–Манна–Уитни для сравнения средних, корреляционный анализ по Спирмену. Обработка материала проведена с использованием пакета программ Statistica 10.0 (StatSoft, США, Windows XP).

Результаты

Результаты определения содержания С-пептида в сыворотке крови больных СД-1 представлены в таблице 1.

Как следует из представленных в таблице 1 данных, во всех группах обследуемых пациентов уровень С-пептида был снижен по сравнению с контрольной группой (I группа). Достоверное снижение С-пептида по сравнению с группой контроля ($p < 0,01$) наблюдалось уже на ранних сроках заболевания (группы Па и Пб). Полученные результаты согласуются с данными литературы о том, что клиническая манифестация СД-1 происходит после разрушения 80-90% островков Лангерганса [26, 31]. Наиболее выраженное снижение секреторной функции β -клеток было выявлено при длительности течения СД-1 более 15 лет (группы Пб и Пбб). Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что содержание С-пептида изменялось независимо от состояния компенсации углеводного обмена и было ассоциировано с продолжительностью заболевания.

Результаты оценки спонтанного и индуцированного апоптоза в культуре мононуклеаров периферической крови *in vitro* представлены в таблице 2. Во всех группах обследуемых лиц наибольший апоптотический ответ на ФГА и инсулин отмечался на 6 сутки культивирования. На рисунках 2 и 3 представлены гистограммы, иллюстрирующие процент гиподиплоидных клеток в культурах мононуклеаров на 6 сутки культивирования с ФГА и инсулином соответственно.

Как видно из данных, представленных в таблице 2, во всех группах обследованных больных СД-1 апоптотический ответ на стимуляцию ФГА был достоверно выше, чем в контрольной группе, и достигал максимальных значений у больных в состоянии декомпенсации с длительностью заболевания более 15 лет (Пб группа). Полученные данные свидетельствуют о повышенной чувствительности мононуклеаров больных СД-1 к активационному апоптозу, более выраженной при декомпенсации углеводного обмена (Па и Пб группы). Принимая во внимание, что в ответ

ТАБЛИЦА 2. КОЛИЧЕСТВО (%) ГИПОДИПЛОИДНЫХ КЛЕТОК, ХАРАКТЕРИЗУЮЩЕЕ ИНТЕНСИВНОСТЬ СПОНТАННОГО И ИНДУЦИРОВАННОГО АПОПТОЗА МОНОЯДРОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ БОЛЬНЫХ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ 1 ТИПА (СД-1)

TABLE 2. NUMBER (%) OF HYPODIPLOID CELLS CHARACTERIZING THE INTENSITY OF SPONTANEOUS AND INDUCED APOPTOSIS OF PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELLS IN PATIENTS WITH TYPE 1 DIABETES MELLITUS (T1DM)

Группы Groups	% гиподиплоидных клеток % hypodiploid cells									
	0 часов 0 hours		24 часа 24 hours		72 часа 72 hours		144 часа 144 hours			
	Спонтанный apoptosis	Индукционный apoptosis	Спонтанный apoptosis	Индукционный apoptosis	Спонтанный apoptosis	Индукционный apoptosis	Спонтанный apoptosis	Индукционный apoptosis		
I	1,4	3,9	8,2	5,2	4,7	12,1	6,2	6,5	15,6	8,0
IIa	5,1*	9,4*	20,1*	8,9	17,3**	39,8*	10,7	30,1**	59,4**	18,6*
IIб IIb	6,2*	14,1*	22,8**	7,8	23,5**	46,8**	9,4	35,8*	66,9**	16,1*
IIIa	1,9	5,1	16,3*	11,8*	6,8	24,9*	19,1*	10,9	39,8*	30,2**
IIIб IIIb	1,6	5,8	17,0*	12,1*	7,3	26,1*	16,4*	9,8	36,2*	29,5**

Примечание. * – различия по изучаемому показателю с контрольной группой статистически достоверны ($p < 0,05$); ** – различия по изучаемому показателю с контрольной группой статистически достоверны ($p < 0,01$). ФГА – фитогемагглютинин, ИНС – инсулин.

Note. *, differences in the studied indicator with the control group are statistically significant ($p < 0.05$); **, differences in the studied indicator with the control group are statistically significant ($p < 0.01$). PHA, phytohemagglutinin; INS, insulin.

на стимуляцию ФГА апоптозу подвергаются преимущественно Т-клетки [4, 9], можно говорить о высокой чувствительности активированных Т-лимфоцитов больных СД-1 к индукции апоптоза.

Уровень спонтанного апоптоза при СД-1 изменялся в зависимости от состояния компенсации углеводного обмена. При компенсированном СД-1 (IIIa и IIIб группы) процент гиподиплоидных клеток в контрольной пробе (без добавления индукторов) был сопоставим с контрольной группой. У больных с гипергликемией (IIa и IIб группы) достоверное повышение процента гиподиплоидных клеток по сравнению с больными в состоянии компенсации СД-1 (IIIa и IIIб группы) и контрольной группой (I группа) наблюдалось сразу после выделения клеток (0 часов инкубации), что позволяет предположить наличие зависимости между уровнем гликемии и интенсивностью спонтанного апоптоза у больных СД-1. Согласно данным литературы, хроническая гипергликемия индуцирует р53-опосредованный апоптоз клеток-мишеней, который реализуется через активацию эффекторной каспазы-3 [11, 28].

У больных СД-1 было выявлено достоверное повышение апоптотического ответа на инсулин по сравнению с контрольной группой (табл. 2). Установлено, что инсулин не является митогеном, однако он предотвращает возвращение в состояние покоя клеток, предварительно простимулированных митогенами [5, 23]. У больных СД-1 лимфоциты *in vivo* преактивированы аутоантигенами поджелудочной железы [29], что может объяснить их более высокий апоптотический ответ на инсулин по сравнению с контрольной группой.

При декомпенсации углеводного обмена дополнительным стимулирующим активацию лимфоцитов фактором является гипергликемия, которая способна индуцировать активационный апоптоз лимфоцитов путем усиления экспрессии на их мембране Fas-рецептора и рецептора фактора некроза опухоли 1 типа (TNFR1 – Tumor Necrosis Factor Receptor 1) [26, 29]. Возможно, это объясняет высокий уровень спонтанного апоптоза у больных СД-1 в состоянии декомпенсации (табл. 2). Добавление в клеточную культуру инсулина способствует повышению утилизации клетками глюкозы и, вероятно, ингибированию апоптоза, индуцированного гипергликемией. Это объясняет уменьшение количества гиподиплоидных клеток в культуральной среде в ответ на введение инсулина по сравнению с уровнем спонтанного апоптоза при декомпенсации, наблюдаемое на протяжении всего периода культивирования (табл. 2).

Как показано на рисунке 3Б, максимальный апоптотический ответ на инсулин был отмечен при компенсации углеводного обмена (IIIa и IIIб группы). Согласно данным литературы, у больных в состоянии компенсации СД-1 культивирование лимфоцитов с инсулином *in vitro* значительно повышало их чувствительность к анти-Fas IgM-индуцированному апоптозу [29]. Таким образом, полученные результаты указывают на то, что при СД-1 адекватно подобранная доза инсулина способствует не только достижению нормогликемии *in vivo*, но и элиминации аутореактивных Т-лимфоцитов путем апоптоза.

У больных СД-1 была выявлена прямая корреляционная зависимость между уровнем спонтанного и индуцированного ФГА апоптоза мононуклеаров и содержанием глюкозы в крови ($r = 0,76$; $p < 0,01$ и $r = 0,81$; $p < 0,01$ соответственно) и обратная зависимость между уровнем спонтанного и индуцированного апоптоза и концентрацией С-пептида в сыворотке крови ($r = -0,68$; $p < 0,05$ и $r = -0,75$; $p < 0,01$ соответственно). Менее сильная прямая корреляционная зависимость была установлена между процентом контрольных и стимулированных инсулином гиподиплоидных клеток и концентрацией глюкозы ($r = 0,59$; $p < 0,05$ и $r = 0,61$; $p < 0,01$ соответственно) и обратная связь между уровнем спонтанного и индуцированного апоптоза мононуклеаров и содержанием С-пептида в крови ($r = -0,62$; $p < 0,01$ и $r = -0,58$; $p < 0,05$ соответственно). Таким образом, выраженность спонтанного и индуцированного апоптоза мононуклеаров периферической крови больных СД-1 коррелирует с состоянием декомпенсации заболевания и степенью нарушения секреторной функции β -клеток.

Обсуждение

Анализируя полученные данные, отметим, что они находятся в соответствии с современной концепцией иммунопатогенеза СД-1, согласно которой развитие аутоиммунных заболеваний связано с усиленным апоптозом клеток-мишеней и дефектом фагоцитарного клиренса апоптотических клеток [13, 14]. В основе этих заболеваний лежит нарушение эффероцитоза – фагоцитоза апоптотических клеток [13, 14, 18, 20].

Повышение чувствительности Т-лимфоцитов к индукции апоптоза, усиление спонтанного и индуцированного апоптоза мононуклеаров периферической крови при СД-1, наблюдаемое в нашем исследовании, может быть объяснено их предсуществующей активацией аутоантигенами, главным образом апоптотическими β -клетками, неэффективный клиренс которых индуцирует дополнительное воспаление и аутоиммунитет [14, 18, 20, 31]. Избыточное накопление ДНК апопто-

тических клеток вследствие их несвоевременного удаления и/или усиления скорости апоптоза клеток-мишеней приводит к дополнительному срыву аутоотолерантности и воспалению, в том числе за счет избыточного локального синтеза триады провоспалительных цитокинов – TNF α , IL-1 β и IFN γ , известных своими проапоптогенными свойствами [15, 20]. Данная комбинация цитокинов реализует программу апоптотической гибели β -клеток через активацию транскрипционных факторов JNK (с-Jun N-terminal kinase – с-Jun N-концевая киназа), NF- κ B (Nuclear Factor of κ -chain В lymphocytes – ядерный фактор каппацепи В-лимфоцитов) и STAT-1 (Signal Transducers and Activators of Transcription – проводники сигналов и активаторы транскрипции), стимулирующих синтез iNOS с последующим образованием NO. Этот механизм апоптоза β -клеток является универсальным при СД-1, независимо от продолжительности заболевания и состояния компенсации углеводного обмена [26, 30, 31].

Гипергликемия, являясь мощным индуктором апоптоза практически в любых тканях, в том числе в островковой ткани поджелудочной железы, помимо цитокин-опосредованного апоптоза, инициирует апоптотическую гибель β -клеток за счет индукции окислительного и метаболического стресса, ER-стресса (стресса эндоплазматического ретикулула), избыточной генерации ROS (активных форм кислорода), повышения экспрессии гликопротеина CD36 (Fatty Acid Transporter Protein – белок-переносчик жирных

кислот), непосредственно участвующего в клеточно-опосредованном апоптозе β -клеток [11, 28]. Согласно данным последних экспериментальных исследований, хроническая гипергликемия не только вызывает устойчивую активацию сигнального каскада Rac1 (Ras-связанный субстрат 1, малый G-белок) \rightarrow Nox2 (НАДФН оксидаза 2) \rightarrow p38MAPK (митоген-активируемая протеинкиназа p38) \rightarrow p53 \rightarrow caspase-3 с реализацией апоптоза β -клеток по митохондриальному пути, но и увеличивает скорость апоптоза β -клеток, что приводит к нарушению их эффероцитоза [11, 28, 31]. Таким образом, полученные нами результаты о максимальном повышении спонтанного и индуцированного апоптоза лимфоцитов периферической крови при декомпенсации СД-1 объясняются не только влиянием гипергликемии, но и вторичным иммунным ответом на так называемые «поздние апоптотические» или «вторичные некротические» β -клетки вследствие их неэффективного фагоцитарного клиренса [27, 31].

Благодарности

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов и выражают благодарность за сотрудничество коллективу эндокринологического отделения Елизаветинской городской больницы и сотрудникам лаборатории клеточного и гуморального иммунитета Всероссийского центра экстренной и радиационной медицины им. А.М. Никифорова г. Санкт-Петербурга за предоставление базы для обследования пациентов.

Список литературы / References

1. Васина Л.В., Иванов Г.А., Луговая А.В., Морозова Л.Ю. Изменение циркулирующих CD59⁺-лимфоцитов периферической крови при остром коронарном синдроме // Вестник Санкт-Петербургского государственного университета, 2008. № 1. С. 6-12. [Vasina L.V., Ivanov G.A., Lugovaya A.V., Morozova L.Yu. Change of content of circulating CD59⁺ cells of peripheral blood at acute coronary syndrome. *Vestnik Sankt-Peterburgskogo gosudarstvennogo universiteta = Bulletin of St. Petersburg State University*, 2008, no. 1, pp. 6-12. (In Russ.)]
2. Васина Л.В., Луговая А.В., Петрищев Н.Н., Серебряная Н.Б. Патогенетическое значение изменения относительного содержания аннексин V⁺-мононуклеаров и CD59⁺-лимфоцитов периферической крови при остром коронарном синдроме // Медико-биологические и социально-психологические проблемы безопасности в чрезвычайных ситуациях, 2008. № 1. С. 74-80. [Vasina L.V., Lugovaya A.V., Petrishev N.N., Serebryanaya N.B. Pathogenic significance of relative alteration in V-binding mononuclears and CD 59⁺ lymphocytes of peripheral blood in patients with acute coronary syndrome. *Mediko-biologicheskie i sotsialno-psikhologicheskie problemy bezopasnosti v chrezvychaynykh situatsiyakh = Medico-Biological and Socio-Psychological Problems of Safety in Emergency Situation*, 2008, no. 1, pp. 74-80. (In Russ.)]
3. Зурочка А.В., Давыдова Е.В., Альтман Д.А. Интенсивность процессов апоптоза и пролиферации лимфоцитов в условиях дислипидемии при ранних формах хронической ишемии мозга // Медицинская иммунология, 2014. Т. 16, № 1. С. 27-34. [Zurochka A.V., Davydova E.V., Altman D.A. Intensity of apoptotic and proliferative events in lymphocytes under dyslipidemic conditions at early stages of chronic brain ischemia. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2014, Vol. 16, no. 1, pp. 27-34. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2014-1-27-34.
4. Зурочка А.В., Хайдуков С.В., Кудрявцев И.В., Черешнев В.А. Проточная цитометрия в биомедицинских исследованиях. Екатеринбург: РИО УрО РАН, 2018. 720 с. [Zurochka A.V., Khaidukov S.V., Kudriavtsev I.V., Chereshev V.A. Flow cytometry in biomedical research]. Ekaterinburg: RIO UB RAS, 2018. 720 p.

5. Иммунология: в 3-х т. Т. 1. Пер. с англ. / Под ред. У. Пола. М.: Мир, 1988. 476 с. [Fundamental Immunology. Ed. William E. Paul, M.D]. Moscow: Mir, 1988. 476 p.
6. Кудрявцев И.В., Головкин А.С., Зурочка А.В., Хайдуков С.В. Современные методы и подходы к изучению апоптоза в экспериментальной биологии // Медицинская иммунология, 2012. Т. 14, № 6. С. 461-482. [Kudriavtsev I.V., Golovkin A.S., Zurochka A.V., Khaidukov S.V. Modern technologies and approaches to apoptosis studies in experimental biology. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2012, Vol. 14, no. 6, pp. 461-482. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2012-6-461-482.
7. Петрищев Н.Н., Васина Л.В., Луговая А.В. Содержание растворимых маркеров апоптоза и циркулирующих аннексин V-связанных апоптотических клеток в крови больных острым коронарным синдромом // Вестник Санкт-Петербургского государственного университета, 2008. № 1. С. 14-24. [Petrishchev N.N., Vasina L.V., Lugovaya A.V. Content of soluble markers of apoptosis and circulating V annexin-connected apoptotic cells in the blood of patients with acute coronary syndrome. *Vestnik Sankt-Peterburgskogo gosudarstvennogo universiteta = Bulletin of St. Petersburg State University*, 2008, no. 1, pp. 14-24. (In Russ.)]
8. Хайтов Р.М. Иммунология: учебник. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2018. 496 с. [Khaitov R.M. Immunology: textbook]. Moscow: GEOTAR-Media, 2018. 496 p.
9. Ярилин А.А., Никонова М.Ф., Ярилина А.А., Варфоломеева М.И., Григорьева Т.Ю. Апоптоз, роль в патологии и значимость его оценки при клинико-иммунологическом обследовании больных // Медицинская иммунология, 2000. Т. 2, № 1. С. 7-16. [Yarilin A.A., Nikonova M.F., Yarilina A.A., Varfolomeeva M.I., Grigorieva T.Yu. Apoptosis, importance of its evaluation in immunopathological states. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2000, Vol. 2, no. 1, pp. 7-16. (In Russ.)]
10. Ardestani A., Maedler K. MST1: a promising therapeutic target to restore functional beta cell mass in diabetes. *Diabetologia*, 2016, Vol. 59, no. 9, pp. 1843-1849.
11. Baidwan S., Chekuri A., Hynds D.L., Kowluru A. Glucotoxicity promotes aberrant activation and mislocalization of Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 [Rac1] and metabolic dysfunction in pancreatic islet β -cells: reversal of such metabolic defects by metformin. *Apoptosis*, 2017, Vol. 22, no. 11, pp. 1380-1393.
12. Banfalvi G. Methods to detect apoptotic cell death. *Apoptosis*, 2017, Vol. 22, no. 2, pp. 306-323.
13. Birge R.B., Boeltz S., Kumar S., Carlson J., Wanderley J., Calianese D., Barcinski M., Brekken R.A., Huang X., Hutchins J.T., Freimark B., Empig C., Mercer J., Schroit A.J., Schett G., Herrmann M. Phosphatidylserine is a global immunosuppressive signal in efferocytosis, infectious disease, and cancer. *Cell Death Differ.*, 2016, Vol. 23, pp. 962-978.
14. Blander J.M. The many ways tissue phagocytes respond to dying cells. *Immunol. Rev.*, 2017, Vol. 277, no. 1, pp. 158-173.
15. Brozzi F., Nardelli T.R., Lopes M., Millard I., Barthson J., Mariana I., Grieco A.F., Villate O., Oliveira J.M., Casimir M., Bugliani M., Engin F., Hotamisligil G.S., Marchetti P., Eizirik D.L. Cytokines induce endoplasmic reticulum stress in human, rat and mouse beta cells via different mechanisms. *Diabetologia*, 2015, Vol. 58, no. 10, pp. 2307-2316.
16. Elmore S.A., Dixon D., Hailey J.R., Harada T., Herbert R.A., Maronpot R.R., Nolte T., Rehg J.E., Rittinghausen S., Rosol T.J., Satoh H., Vidal J.D., Willard-Mack C.L., Creasy D.M. Abstract Recommendations from the INHAND Apoptosis/Necrosis Working Group. *Toxicol. Pathol.*, 2016, Vol. 44, no. 2, pp. 173-188.
17. Fu D., Yu J.Y., Yang S., Wu M., Hammad S.M., Connel A. R., Du M., Chen J., Lyons T. J. Survival or death: a dual role for autophagy in stress-induced pericyte loss in diabetic retinopathy. *Diabetologia*, 2016, Vol. 59, no. 10, pp. 2251-2261.
18. Garg A.D., Romano E., Rufo N., Agostinis P. Immunogenic versus tolerogenic phagocytosis during anticancer therapy mechanisms and clinical translation. *Cell Death Differ.*, 2016, Vol. 23, pp. 938-951.
19. Green D.R. Cell death and the immune system: getting to how and why. *Immunol. Rev.*, 2017, Vol. 277, no. 1, pp. 4-8.
20. Green D.R., Oguin T.H., Martinez J. The clearance of dying cells: table for two. *Cell Death Differ.*, 2016, Vol. 23, pp. 915-926.
21. Hakonen E., Chandral V., Fogarty C.L., Yu N.Y., Ustinov J., Katayama S., Galli E., Danilova T., Lindholm P., Vartiainen A., Einarsdottir E., Krjutškov K., Kere J., Saarma M., Lindah M., Otonkoski T. MANF protects human pancreatic beta cells against stress-induced cell death. *Diabetologia*, 2018, Vol. 61, no. 10, pp. 2202-2214.
22. Hammes H.P. Diabetic retinopathy: hyperglycaemia, oxidative stress and beyond. *Diabetologia*, 2018, Vol. 61, no. 1, pp. 29-38.
23. Kumagai J., Akiyama H., Iwashita S., Iida H., Yahara I. *In vitro* regeneration of resting lymphocytes from stimulated lymphocytes and its inhibition by insulin. *J. Immunol.*, 1981, Vol. 126, no. 4, pp. 1249-1254.
24. Pasparakis M., Vandenabeele P. Necroptosis and its role in inflammation. *Nature*, 2015, Vol. 517, pp. 311-320.
25. Purwana I., Liu J.J., Portha B., Buteau J. HSF1 acetylation decreases its transcriptional activity and enhances glucolipotoxicity-induced apoptosis in rat and human beta cells. *Diabetologia*, 2017, Vol. 60, no. 8, pp. 1432-1441.
26. Ryan A., Murphy M., Godson C., Hickey F.B. Diabetes mellitus and apoptosis: inflammatory cells. *Apoptosis*, 2009, Vol. 14, no. 12, pp. 1435-1450.
27. Sachet M., Liang Y.Y., Oehler R. The immune response to secondary necrotic cells. *Apoptosis*, 2017, Vol. 22, no. 10, pp. 1189-1204.

28. Sidarala V., Kowluru A. Exposure to chronic hyperglycemic conditions results in Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 (Rac1)-mediated activation of p53 and ATM kinase in pancreatic β -cells. *Apoptosis*, 2017, Vol. 22, no. 5, pp. 597-607.
29. Tchorzewski H., Glowacka M., Banasik P., Lewkowicz M., Szalapska-Zawodniak M. Activated T lymphocytes from patients with high risk of type I diabetes mellitus have different ability to produce interferon- γ , interleukin-6 and interleukin-10 and undergo anti-CD95 induced apoptosis after insulin stimulation. *Immunol. Lett.*, 2001, Vol. 75, pp. 225-234.
30. Thomas H.E., Trapani J.A., Kay T.W.H. The role of perforin and granzymes in diabetes. *Cell Death Differ.*, 2010, Vol. 17, pp. 577-585.
31. Vives-Pi M., Rodriguez-Fernandez S., Pujol-Autonell I. How apoptotic β -cells direct immune response to tolerance or to autoimmune diabetes: a review. *Apoptosis*, 2015, Vol. 20, no. 3, pp. 263-272.
32. Weinlich R., Oberst A., Beere H.M., Green D.R. Necroptosis in development, inflammation and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, 2016, Vol. 18, pp. 127-136.
33. Zhang M., Zhang L., Hu J., Lin J., Tingting W., Duan Y., Man W., Feng J., Sun L., Jia H., Li C., Zhang R., Wang H., Sun D. MST1 coordinately regulates autophagy and apoptosis in diabetic cardiomyopathy in mice. *Diabetologia*, 2016, Vol. 59, no. 11, pp. 2435-2447.
34. Zhao Y., Scott N.A., Fynch S., Elkerbout L., Wong W.W., Mason K.D., Strasser A., Huang D.C., Kay T.W.H., Thomas H.E. Autoreactive T cells induce necrosis and not BCL-2-regulated or death receptor-mediated apoptosis or RIPK3-dependent necroptosis of transplanted islets in a mouse model of type 1 diabetes. *Diabetologia*, 2015, Vol. 58, no. 1, pp. 140-148.

Авторы:

Луговая А.В. — к.м.н., врач аллерголог-иммунолог, врач клинической лабораторной диагностики отделения лабораторной диагностики клиники ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Калинина Н.М. — д.м.н., профессор кафедры иммунологии ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ; врач аллерголог-иммунолог, главный научный сотрудник ФГБУ «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А.М. Никифорова» МЧС России Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Authors:

Lugovaya A.V., PhD (Medicine), Allergist-Immunologist, Doctor of Clinical Laboratory Diagnostics, Department of Clinical Laboratory Diagnostics, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Kalinina N.M., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Immunology, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University; Leading Research Associate, Allergist-Immunologist, Main Research Associate, A. Nikiforov Russian Center of Emergency and Radiation Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Митрейкин В.Ф. — д.м.н., профессор кафедры патологической физиологии ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Эмануэль Ю.В. — к.м.н., врач-невролог, доцент кафедры неврологии и мануальной медицины факультета последипломного образования ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Ковальчук Ю.П. — к.м.н., доцент кафедры клинической лабораторной диагностики с курсом молекулярной медицины, заместитель главного врача отделения лабораторной диагностики клиники ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Артемова А.В. — врач-невролог, старший лаборант кафедры неврологии и мануальной медицины факультета последипломного образования ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Mitreikin V.Ph., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Pathological Physiology, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Emanuel Yu.V., PhD (Medicine), Clinical Neurologist, Associate Professor, Department of Neurology and Manual Medicine, Faculty of Postgraduate Education, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Kovalchuk Yu.P., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Clinical Laboratory Diagnostics with a course of Molecular Medicine, Deputy Head Physician, Department of Clinical Laboratory Diagnostics, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Artyomova A.V., Clinical Neurologist, Senior Laboratory Assistant, Department of Neurology and Manual Medicine, Faculty of Postgraduate Education, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Поступила 18.07.2019
Принята к печати 27.09.2019

Received 18.07.2019
Accepted 27.09.2019