

ОЦЕНКА ЛОКАЛЬНОГО ПРОФИЛЯ ЦИТОКИНОВ, ЭКСПРЕССИРУЕМЫХ НАТИВНЫМИ КЛАПАНАМИ СЕРДЦА, ПОЛУЧЕННЫМИ ОТ ПАЦИЕНТОВ С ИНФЕКЦИОННЫМ ЭНДОКАРДИТОМ

**Синицкая А.В., Синицкий М.Ю., Казачек Я.В., Евтушенко А.В.,
Хуторная М.В., Асанов М.А., Поддубняк А.О., Понасенко А.В.**

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

Резюме. Инфекционный эндокардит характеризуется дисфункцией клапанов сердца и вносит значительный вклад в структуру заболеваемости и смертности среди всех патологий сердечно-сосудистой системы. Иммунный ответ играет важную роль в патофизиологии данного заболевания. Структурные модификации в генах, кодирующих молекулы, вовлеченные в иммунный ответ, а также изменение их экспрессии, могут приводит к изменению функциональной активности и количества синтезируемых белков, что, в свою очередь, оказывает влияние на эффективности иммунного ответа. Целью исследования стала оценка локального профиля цитокинов, экспрессируемых нативными клапанами сердца, полученными от пациентов с инфекционным эндокардитом в процессе кардиохирургического вмешательства.

Профиль секретируемых цитокинов изучали в нативных клапанах сердца, полученных от 4 пациентов с инфекционным эндокардитом (экспериментальная группа) и 10 пациентов с ревматической болезнью сердца (контрольная группа) методом дот-блоттинга с использованием наборов Proteome Profiler™ Human Cytokine Array Kit (ARY005B). Результаты дот-блоттинга подтверждали путем оценки уровня экспрессии соответствующих генов с помощью количественной полимеразной цепной реакции после обратной транскрипции с использованием праймеров, синтезированных компанией «Евроген» (Москва, Россия).

Белки MIF, PAI-1, ICAM-1 и CXCL12 обнаружены в образцах нативных клапанов как экспериментальной, так и контрольной групп. В результате полуколичественного анализа установлено, что клапаны, пораженные инфекционным эндокардитом, характеризовались четырехкратным повышением секреции PAI-1 и двухкратным снижением секреции молекул ICAM-1 и CXCL12 по сравнению с

Адрес для переписки:

Синицкая Анна Викторовна
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
комплексных проблем сердечно-сосудистых
заболеваний»
650002, Россия, г. Кемерово,
б-р им. акад. Леонида Барбараша, 6.
Тел.: 8 (3842) 64-46-50.
E-mail: ceoav1991@gmail.com

Address for correspondence:

Anna V. Sinitzkaya
Research Institute for Complex Issues
of Cardiovascular Diseases
6 Acad. L.S. Barbarash Blvd
Kemerovo
650002 Russian Federation
Phone: +7 (3842) 64-46-50.
E-mail: ceoav1991@gmail.com

Образец цитирования:

А.В. Синицкая, М.Ю. Синицкий, Я.В. Казачек,
А.В. Евтушенко, М.В. Хуторная, М.А. Асанов,
А.О. Поддубняк, А.В. Понасенко «Оценка локального
профиля цитокинов, экспрессируемых нативными
клапанами сердца, полученными от пациентов с
инфекционным эндокардитом» // Медицинская
иммунология, 2024. Т. 26, № 6. С. 1223-1234.
doi: 10.15789/1563-0625-CEP-2869

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

For citation:

A.V. Sinitzkaya, M.Yu. Sinitzky, Ya.V. Kazachek,
A.V. Evtushenko, M.V. Khtornaya, M.A. Asanov,
A.O. Poddubnyak, A.V. Ponasenko "Cytokine expression profile
of native heart valves obtained from patients with infective
endocarditis", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya
Immunologiya, 2024, Vol. 26, no. 6, pp. 1223-1234.
doi: 10.15789/1563-0625-CEP-2869

© Sinitzkaya A.V. et al., 2024
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.15789/1563-0625-CEP-2869

контрольной группой. MIF экспрессировался на одном и том же уровне в обеих изученных группах. Белки IL-1ra, IL-6, IL-8, IL-16, CCL4, CCL5 и CXCL1 обнаружены только в клапанах, пораженных инфекционным эндокардитом. Кроме того, показано, что экспериментальная группа характеризовалась повышением экспрессии генов *MIF*, *IL6*, *IL8*; а также снижением уровня мРНК генов *PAI1*, *IL1RA* и *CXCL1* относительно контроля.

Таким образом, нативные клапаны сердца, пораженные инфекционным эндокардитом, характеризуются развитием локального воспаления, вызванного патогенной бактериемией, и активной неоваскуляризацией.

Ключевые слова: инфекционный эндокардит, нативные клапаны сердца, патогенная бактериемия, воспаление, генная экспрессия, цитокины

CYTOKINE EXPRESSION PROFILE OF NATIVE HEART VALVES OBTAINED FROM PATIENTS WITH INFECTIVE ENDOCARDITIS

Sinitskaya A.V., Sinitsky M.Yu., Kazachek Ya.V., Evtushenko A.V., Khutornaya M.V., Asanov M.A., Poddubnyak A.O., Ponasenko A.V.

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

Abstract. Infectious endocarditis is characterized by dysfunction of heart valves and contribute significantly to the cardiovascular morbidity and mortality worldwide, especially in low- and middle-income countries. Immune response is playing the important role in the pathophysiology of this disease. This work was aimed to study the local cytokine profile in native heart valves obtained from the patients with infectious endocarditis. Cytokine profiling were performed in biopsies of native heart valves explanted from 4 patients with infective endocarditis (experimental group) and 10 patients with rheumatic heart disease (comparison group) by dot blotting using the Proteome Profiler™ Human Cytokine Array Kit (ARY005B). The results of dot blotting were validated by the gene expression profiling using quantitative polymerase chain reaction. MIF, PAI-1, ICAM-1 and CXCL12 were found in the native heart valves explanted from both infective endocarditis and rheumatic heart disease patients. Upon a semi-quantitative assessment, the heart valves explanted from the infective endocarditis patients were characterized by 4-fold increased secretion of PAI-1 and twofold decreased secretion of ICAM-1 and CXCL12 compared to the heart valves affected by rheumatic heart disease. MIF was expressed on similar levels in the both studied groups. IL-1ra, IL-6, IL-8, IL-16, CCL4, CCL5 and CXCL1 were detected only in heart valves affected by infectious endocarditis. At the gene expression level, *MIF*, *IL6*, *IL8* genes were upregulated and *PAI1*, *IL1RA*, *CXCL1* genes were downregulated in heart valves explanted from infectious endocarditis patients compared to the subjects affected by rheumatic heart disease. Native heart valves in cases of infectious endocarditis are characterized by nonspecific local inflammatory response associated with pathogenic bacteremia, along with active neovascularization. The data obtained can help to better understand fundamental pathogenetic mechanisms of infectious endocarditis.

Keywords: infectious endocarditis, native heart valves, pathogenic bacteremia, inflammation, gene expression, proteomic profile

Исследование выполнено при поддержке комплексной программы фундаментальных научных исследований СО РАН в рамках фундаментальной темы НИИ КПССЗ № 0419-2022-0001.

Введение

Инфекционный эндокардит (ИЭ) – это воспалительное заболевание, поражающие клапаны сердца и другие части эндокарда, основным эти-

ологический агентом которого являются различные микроорганизмы [2, 6] и грибы [1]. Частота данной патологии варьирует от 1 до 10 случаев на 100 000 человек, а госпитальная летальность достигает 40% [12]. Примерно 50% пациентов нуждается в оперативном вмешательстве, сопряженном с 15-25% госпитальной летальностью и 40% риском смерти в течение года после операции [12, 25]. Таким образом, поиск маркеров, ас-

социированных с повышенным риском развития ИЭ и исследование вклада молекулярно-генетических факторов в его патогенез представляется актуальным для современной биомедицинской науки.

Патогенез ИЭ представляет собой комплексный процесс, в который вовлечено множество различных факторов. Патоген, попавший в организм, с током крови переносится к эндокарду, где прикрепляется к эндотелию. Далее запускается иммунный ответ, являющийся важнейшим фактором, влияющим на прогрессирование ИЭ. Активность белков, вовлеченных в воспалительный сигналинг, запуск и рестрикцию иммунного ответа, ассоциирована с риском развития ИЭ, особенностями его протекания и исхода [26]. Известно, что иммунный ответ генетически детерминирован. Структурные модификации в генах, кодирующих молекулы, вовлеченные в иммунный ответ, а также изменение их экспрессии, могут приводить к изменению функциональной активности и количества синтезируемых белков, что, в свою очередь, оказывает влияние на эффективности иммунного ответа [34]. Все это обуславливает важность изучения молекулярных основ иммунного ответа на патогенную бактерию, приводящую к развитию ИЭ, как для фундаментальной, так и для прикладной медицины.

Материалы и методы

В представленное ретроспективное исследование были включены пациенты, проходившие лечение в Научно-исследовательском институте комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний (Кемерово, Россия) в 2022 году. Биопсия нативных митральных клапанов сердца была получена в процессе кардиохирургических вмешательств от 4 пациентов с инфекционным эндокардитом (экспериментальная группа) и 10 пациентов с ревматической болезнью сердца (РБС) (контрольная группа). После резекции клапаны помещали в стабилизатор RNeasy Lysis Solution (Qiagen, США) и транспортировали в лабораторию для дальнейшего анализа. Полная характеристика пациентов, включенных в исследование, представлена в таблице 1. ИЭ диагностировали на основе клинических данных, результатов эхокардиографии и микробиологического исследования образцов крови (культуры на различных питательных средах). У всех пациентов из экспериментальной группы в ходе эхокардиографии регистрировали подвижные вегетации на

нативных клапанах сердца. В дополнение, диагноз верифицировали в соответствии с международными модифицированными критериями Дьюка [16]. РБС диагностировали при наличии патологических шумов в сердце, выявляемых в процессе аускультации с последующей электрокардиографией и верификацией в соответствии с критериями Джонса [11, 13]. Пациенты с онкологическими, аутоиммунными и психическими заболеваниями, острыми или обострившимися хроническими инфекционными патологиями были исключены из исследования. Исследование выполнено в соответствии со стандартами надлежащей клинической практики (Good Clinical Practice) и принципами Хельсинкской декларации. Протокол исследования одобрен локальным этическим комитетом ФГБНУ НИИ КПССЗ. До включения в исследование у всех участников получено добровольное письменное информированное согласие.

Участки удаленного клапана площадью не более 1 см² измельчали и помещали в пробирку с лизирующим матриксом Lysing Matrix D (MP Biomedicals, США), содержащую 900 мкл лизирующего буфера T-PER™ Tissue Protein Extraction Reagent (Thermo Scientific, США), 9 мкл ингибиторов протеаз Halt™ Protease Inhibitor Cocktail (Thermo Scientific, США) и 9 мкл 0,5 М раствора ЭДТА (Thermo Scientific, США) и гомогенизировали на гомогенизаторе FastPrep-24 5G (MP Biomedicals, США) в режиме 4 цикла по 40 секунд каждый с интервалом 300 секунд между ними. Далее образцы центрифугировали в течение 15 минут на 1200 g при 4 °C, надосадочную жидкость переносили в чистую 1,5 мл пробирку. Концентрацию белка измеряли на спектрофотометре Multiskan Sky Microplate Spectrophotometer (Thermo Scientific, США) с использованием набора Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, США) по протоколу производителя. Уровень экспрессируемых нативными клапанами цитокинов определяли с помощью дот-блоттинга с использованием набора Proteome Profiler™ Human Cytokine Array Kit (ARY005B) (R&D Systems, США) в соответствии с протоколом производителя наборов. Детекцию цитокинов осуществляли на цифровом сканере хемилюминесцентных блотов C-DiGit blot scanner (LI-COR Biosciences, США) в режиме высокой чувствительности (12-минутное сканирование). Полуколичественный анализ цитокинов, секретруемых нативными клапанами сердца, оценивали по площади детектируемых секторов с использованием программы ImageJ (National Institutes of Health, США).

ТАБЛИЦА 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ПАЦИЕНТОВ, ВКЛЮЧЕННЫХ В ИССЛЕДОВАНИЕ

TABLE 1. CLINICAL AND DEMOGRAPHICAL CHARACTERISTICS OF PATIENTS INCLUDED IN THE STUDY

Возраст, лет (M ± SD) Age, years (mean ± SD)		Экспериментальная группа Experimental group (n = 4)	Контрольная группа Control group (n = 10)
		50,7±13,3	52,6±10,1
Пол, n (%) Gender, n (%)	Мужчины Males	1 (25)	3 (30)
	Женщины Females	3 (75)	7 (70)
Локализация нативного клапана, n (%) Location of native heart valve, n (%)	Митральный Mitral	4 (100)	10 (100)
	Аортальный Aortic	0 (0)	0 (0)
	Трикуспидальный Tricuspid	0 (0)	0 (0)
Диагноз, n (%) Diagnosis, n (%)	Инфекционный эндокардит Infective endocarditis	4 (100)	0 (0)
	Ревматическая болезнь сердца Rheumatic heart disease	0 (0)	10 (100)
Этиология Etiology	<i>Streptococcus</i> sp.	4 (100)	0 (0)
	Другие Other	0 (0)	0 (0)

Перед началом выделения РНК все рабочие поверхности и оборудование обрабатывали ингибитором РНКаз RNaseZap™ RNase Decontamination Solution (Invitrogen, США). Участки удаленного клапана площадью не более 1 см² измельчали и помещали в пробирку с лизирующим матриком Lysing Matrix D (MP Biomedicals, США), содержащую 900 мкл лизирующего реагента TRIzol (Invitrogen, США) и гомогенизировали на гомогенизаторе FastPrep-24 5G (MP Biomedicals, США) в режиме 4 цикла по 40 секунд каждый с интервалом 300 секунд между ними. Выделение РНК проводили с помощью коммерческого набора RNeasy® Plus Universal Mini Kit (Qiagen, Германия) в соответствии с протоколом производителя набора. Количество и качество выделенной РНК оценивали с помощью спектрофотометра NanoDrop™ 2000 (Thermo Scientific, США). Целостность РНК определяли на спектрофотометре Qubit 4 (Invitrogen, США). Выделенную РНК хранили при температуре -80 °С.

Комплементарную ДНК (кДНК) синтезировали на основе 100 нг РНК с помощью реакции обратной транскрипции с использованием набора High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, США). Качество синтезиро-

ванной кДНК определяли на спектрофотометре NanoDrop™ 2000 (Thermo Scientific, США). Синтезированную кДНК хранили при температуре -20 °С.

Профиль генной экспрессии оценивали с помощью количественной полимеразной цепной реакции (кПЦР) с использованием SYBR Green зондов (ЗАО «Евроген», Россия) на амплификаторе ViiA7 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, США) (табл. 2). На каждый исследуемый образец готовили 10 мкл реакционной смеси, включающей в себя 5 мкл мастер-микса PowerUp™ SYBR® Green Master Mix (Applied Biosystems, США), по 500 нМ прямого и обратного праймеров и 10 нг кДНК. кПЦР проводили в 96-луночной планшете, включающей в себя анализируемые образцы, пять стандартов с двукратным разведением и отрицательный контроль (реакционная смесь без кДНК). Каждый образец, стандарт и отрицательный контроль анализировался в трех технических повторах. Амплификация проводилась по следующей программе: 2 минуты при 50 °С (1 цикл), 2 минуты при 95 °С (1 цикл), 15 секунд при 95 °С и 1 минута при 60 °С (40 циклов). Результаты кПЦР нормировали с помощью трех референсных генов *ACTB*, *GAPDH*

и *B2M* [32]. Уровень экспрессии генов интереса рассчитывали по методу $2^{-\Delta\Delta Cq}$ и выражали в виде кратности изменения в образцах из экспериментальной группы относительно контроля. Все манипуляции по определению уровня генной экспрессии выполнялись в соответствии с имеющимися рекомендациями [9].

Статистический анализ полученных результатов был выполнен в программе GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, США). Количественные данные выражали в виде медианы (m) и межквартильного размаха (IQR). Различия между группами считали статистически значимыми на уровне $p < 0,05$ (U-тест Манна–Уитни).

Результаты и обсуждение

В результате протеомного профилирования обнаружено, что белки MIF (фактор, ингибирующий миграцию макрофагов), PAI-1 (ингибитор активатора плазминогена-1), ICAM-1 (молекула межклеточной адгезии-1) и CXCL12 (стромальный фактор роста-1) регистрируются в нативных клапанах, полученных и от пациентов с ИЭ, и от пациентов с РБС (рис. 1). В результате полуко-

личественного анализа установлено, что нативные клапаны, полученные от пациентов с ИЭ, характеризуются четырехкратным превышением уровня секреции PAI-1 и двукратным снижением уровня ICAM-1 и CXCL12 в сравнении с контролем. MIF экспрессировался на одинаковом уровне в обеих изученных группах. IL-1ra (антагонист рецептора интерлейкина-1), IL-6 (интерлейкин-6), IL-8 (интерлейкин-8), IL-16 (интерлейкин-16), CCL4 (хемокиновый лиганд-4), CCL5 (хемокиновый лиганд-5) и CXCL1 (хемокиновый лиганд-1) были обнаружены только в клапанах, пораженных ИЭ (рис. 1).

В результате изучения уровня экспрессии генов, кодирующих цитокины, было выделено три группы генов по характеру изменения их экспрессии: (i) гены, экспрессия которых была повышена в экспериментальной группе относительно контроля (*MIF*, *IL6* и *IL8*); (ii) гены, экспрессия которых была понижена в эксперименте относительно контроля (*PAI1*, *IL1RA* и *CXCL1*); (iii) гены, экспрессия которых была одинакова в обеих изученных группах (*ICAM1*, *CXCL12*, *CCL4*, *CCL5* и *IL16*) (табл. 3).

ТАБЛИЦА 2. ХАРАКТЕРИСТИКА ПРАЙМЕРОВ, ИСПОЛЬЗОВАННЫХ В ИССЛЕДОВАНИИ

TABLE 2. CHARACTERISTICS OF PRIMERS USED IN GENE EXPRESSION ANALYSIS

Ген Gene	Прямой праймер Forward primer	Обратный праймер Reverse primer
<i>MIF</i>	5'-GGTGTCCGAGAAGTCAGGCA-3'	5'-GGGGCACGTTGGTGTTCACG-3'
<i>PAI1</i>	5'-CGCCGCCTCTCCACAAATC-3'	5'-AGGGCAGTTCAGGATGTCG-3'
<i>ICAM1</i>	5'-TTGGGCATAGAGACCCCGTT-3'	5'-GCACATTGCTCAGTTCATACACC-3'
<i>CXCL1</i>	5'-GCTTGCCTCAATCCTGCATCC-3'	5'-ACAATCCAGGTGGCCTCTGC-3'
<i>CXCL12</i>	5'-CAGAGCCAACGTCAAGCATCT-3'	5'-AGTGGGTCCAGCGAAAGTCC-3'
<i>CCL4</i>	5'-ACCGCCTGCTGCTTTTCTTAC-3'	5'-GGATTCACTGGGATCAGCACA-3'
<i>CCL5</i>	5'-CCTCTCCCACAGGTACCATGAA-3'	5'-ATGTAGGCAAAGCAGCAGGGT-3'
<i>IL1RA</i>	5'-GGCTGAAAAGCATAGAGGGAAC-3'	5'-CTGGGCTCACAATCACAGG-3'
<i>IL6</i>	5'-GGCACTGGCAGAAAACAACC-3'	5'-GCAAGTCTCCTCATTGAATCC-3'
<i>IL8</i>	5'-CAGAGACAGCAGAGCACAC-3'	5'-AGTTCTTTAGCACTCCTTGGC-3'
<i>IL16</i>	5'-ATCGGCCACAGACCAAGTC-3'	5'-CCATCCGAGCCTGCCTCTTA-3'
<i>ACTB</i>	5'-CATCGAGCACGGCATCGTCA-3'	5'-TAGCACAGCCTGGACAGCAAC-3'
<i>GAPDH</i>	5'-AGCCACATCGCTCAGACAC-3'	5'-GCCCAATACGACCAAATCC-3'
<i>B2M</i>	5'-TCCATCCGACATTGAAGTTG-3'	5'-CGGCAGGCATACTCATCTT-3'

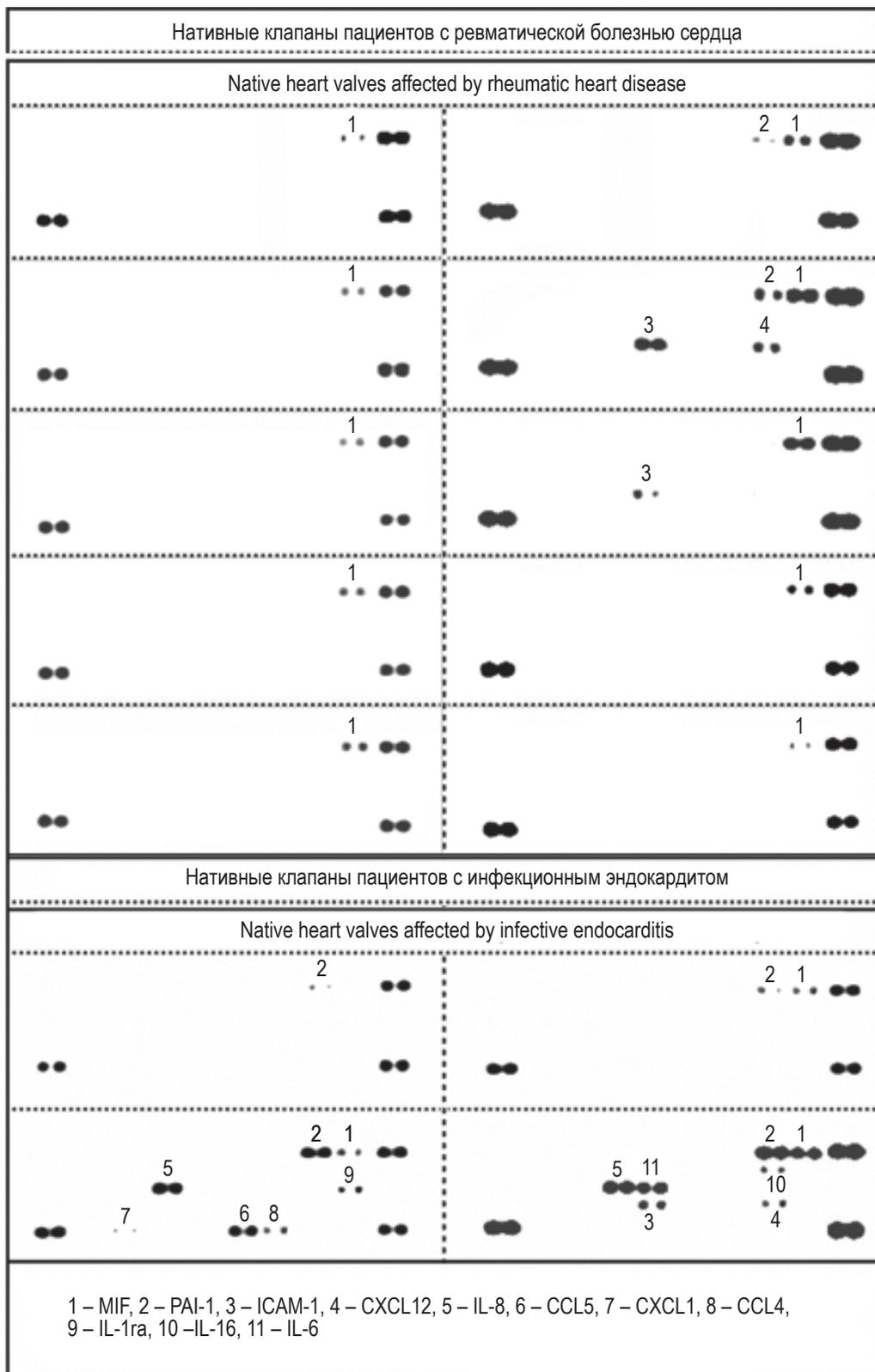


Рисунок 1. Цитокиновый профиль нативных клапанов сердца

Figure 1. Cytokine profile of native heart valves

ТАБЛИЦА 3. ПРОФИЛЬ ГЕННОЙ ЭКСПРЕССИИ НАТИВНЫХ КЛАПАНОВ СЕРДЦА (УСЛОВНЫЕ ЕДИНИЦЫ, $m \pm IQR$)
TABLE 3. GENE EXPRESSION PROFILE OF NATIVE HEART VALVES (ARBITRARY UNITS, $m \pm IQR$)

Ген Gene	Экспериментальная группа Experimental group	Контрольная группа Control group	Кратность изменения относительно контроля Fold-change compared to the control
<i>MIF</i>	0,0169±0,0334*	0,0001±0,0038	169,00
<i>PAI1</i>	0,0099±0,01620**	0,0401±0,0524	0,25
<i>ICAM1</i>	0,0222±0,0222	0,0242±0,0149	0,92
<i>CXCL1</i>	0,0050±0,02570**	0,0103±0,0152	0,49
<i>CXCL12</i>	0,0087±0,0142	0,0093±0,0224	0,93
<i>CCL4</i>	0,0016±0,0078	0,0012±0,0066	1,33
<i>CCL5</i>	0,0031±0,0087	0,0040±0,0059	0,78
<i>IL1RA</i>	0,0016±0,0032**	0,0040±0,0064	0,40
<i>IL6</i>	0,0140±0,0636*	0,0023±0,0054	6,09
<i>IL8</i>	0,0487±0,4209*	0,0050±0,0279	9,74
<i>IL16</i>	0,0201±0,0344	0,0158±0,0436	1,27

Примечание. * – гены с повышенной относительно контроля экспрессией, ** – гены с пониженной относительно контроля экспрессией.

Note. *, upregulated genes compared to the control; **, downregulated genes compared to the control.

В результате проведенного исследования установлено, что нативные клапаны сердца, пораженные ИЭ, характеризуются повышенной экспрессией провоспалительных цитокинов. Данные результаты свидетельствуют о развитии локального иммунного ответа на патогенную бактерию и развитие неспецифического воспаления. Известно, что пациенты с ИЭ и здоровые доноры характеризуются различным профилем секретируемых цитокинов [4, 12, 26]. Макрофаги активно продуцируют провоспалительные цитокины, вовлеченные в воспалительный ответ, в то время как регуляторные и противовоспалительные цитокины контролируют его развитие. Хемокины ответственны за активацию и миграцию лейкоцитов к очагу воспаления, факторы роста активируют или ингибируют пролиферацию клеток. В недавнем исследовании было зарегистрировано повышение концентрации ИЛ-6 и ИЛ-8 в сыворотке крови пациентов с ИЭ в сравнении со здоровыми донорами, а ИЛ-1В обнаруживался только у пациентов с данной патологией [12]. Более того, повышенная концентрация ИЛ-6 и ИЛ-8 ассоциирована с риском летального исхода у пациентов с

ИЭ биологических протезов клапанов сердца [8]. Эффективность иммунного ответа, связанного с риском развития ИЭ, генетически детерминирована: так, генотип G/A гена *IL6* (с.471G>A) и аллель T гена *IL1B* (с.315C>T) ассоциированы с повышенным риском развития данной патологии [15]. Следует отметить, что повышенная экспрессия ИЛ-1В, ИЛ-6 и ИЛ-8 является неспецифическим маркером ИЭ, так как данные цитокины являются белками острой фазы воспаления, активно экспрессируемыми во время развития воспалительного процесса как инфекционной, так и неинфекционной этиологии [29].

Провоспалительный ИЛ-16 представляет собой плейотропный цитокин, оказывающий хемотаксическое действие, главным образом, по отношению к CD4⁺T-клеткам, и играющий важную роль в их привлечении в очаг воспаления с последующей активацией иммунного ответа. Кроме того, ИЛ-16 может активировать секрецию ИЛ-1В, ИЛ-6 и TNFα моноцитами [21, 28]. Таким образом, обнаруженное в нашем эксперименте повышение экспрессии ИЛ-16 в створках нативных клапанов сердца, пораженных ИЭ, может является началь-

ным звеном воспалительного сигналинга, приводящего к развитию локального иммунного ответа на патогенную бактериемию, а также фактором, инициирующим привлечение иммунных клеток к очагу воспаления.

Хемокиновый лиганд-1 (CXCL1) относится к группе CXС хемокинов и играет важную роль в развитии воспалительного процесса в качестве хемоаттрактанта для нейтрофилов [17]. Экспрессия *CXCL1* может регулироваться посредством активации пути NF- κ B [35]. Показано, что стрептококковые глюкозилтрансферазы могут активировать интерстициальные клетки клапанов сердца, что приводит к 16,16-кратному увеличению секреции *CXCL1* и 11,3-кратному увеличению экспрессии гена *CCL4* с последующим привлечением нейтрофилов и CD4⁺T-клеток в очаг воспаления [37].

CCL4, ранее известный как воспалительный белок макрофагов (MIP-1 β), представляет собой небольшой хемокин, который продуцируется различными клетками и действует как хемоаттрактант для естественных киллеров (NK), моноцитов и гранулоцитов в месте воспаленной или поврежденной ткани, что может привести к острому нейтрофильному воспалению. Он также индуцирует синтез и высвобождение других провоспалительных цитокинов, таких как IL-1, IL-6 и TNF α фибробластами и макрофагами [22, 23]. Показано, что повышенная экспрессия *CCL4* ассоциирована с более высокой смертностью у больных ИЭ [26].

CCL5 является классическим провоспалительным хемокином, рекрутирующим T-клетки, эозинофилы, базофилы, моноциты, NK-клетки, дендритные клетки и тучные клетки к месту воспаления [3]. Кроме того, *CCL5* может индуцировать пролиферацию и активацию некоторых NK-клеток с образованием CС-хемокин-активируемых клеток-киллеров [18]. Разнообразие клеток, экспрессирующих и опосредующих эффекты *CCL5*, указывает на то, что этот хемокин участвует во многих биологических процессах, от контроля над патогенами до стимулирования воспаления при некоторых заболеваниях (например, при раке и атеросклерозе) [20].

IL-1 α является членом семейства цитокинов IL-1, ингибирующим провоспалительный эффект IL-1 α и IL-1 β посредством связывания с рецепторами IL-1 [24]. Нарушение регуляции баланса между IL-1 и IL-1 α является одним из факторов патогенеза различных заболеваний [5]. Показано, что уровень IL-1 α в сыворотке крови повышен у больных с сепсисом, раком, метаболическими и аутоиммунными заболева-

ниями, что может свидетельствовать об отсроченной реакции на повышенную секрецию IL-1. Таким образом, IL-1 α может быть использован как мишень для терапии при длительно действующем и/или чрезмерной воспалительной реакции [24].

Ингибитор активатора плазминогена-1 (PAI1) является одним из основных факторов фибринолитической активности в плазме крови человека. Его продукция эндотелиальными клетками, гепатоцитами и фибробластами может быть повышена в присутствии эндотоксина или ряда цитокинов [7]. PAI1 может подавлять активность активаторов плазминогена тканевого и урокиназного типа и формировать протромботический или гипофибринолитический статус, который может обуславливать системную тромбоэмболию [27]. Септические эмболы из вегетаций на сердечных клапанах являются наиболее частой причиной инсульта у пациентов с ИЭ [29]. Известно, что бактериальные инфекции являются фактором риска системной тромбоэмболии; индуцированные воспалением прокоагулянтные изменения активности тромбоцитов играют важную роль в патогенезе данного осложнения [10]. Более того, PAI1 может контролировать ангиогенез — усиление его экспрессии приводит к подавлению трансформации плазминогена в плазмин и синтеза ангиостатина (ингибитора ангиогенеза) [27, 31]. Было высказано предположение, что ИЭ сопровождается неоваскуляризацией вследствие стимулирования экспрессии ангиогенных факторов клапанами сердца [15, 36]. Таким образом, повышенная концентрация PAI1 в нативных клапанах сердца, эксплантированных от пациентов с ИЭ, может быть объяснена активной неоваскуляризацией клапанов в ответ на бактериемию.

Интересно, что мы обнаружили снижение экспрессии ICAM-1 в нативных клапанах сердца, эксплантированных у пациентов с ИЭ. Известно, что активация эндотелия сопровождается повышением экспрессии молекул адгезии, опосредующих адгезию клеток друг к другу, к внеклеточному матриксу и эндотелиальному монослою [14]. Активация эндотелия вносит значительный вклад в системное воспаление в ответ на патогенную бактериемию. Повышенная концентрация VCAM-1 и ICAM-1 зарегистрирована в плазме крови больных с бактериемией; E-селектин и ICAM-1 также были связаны с полиорганной недостаточностью, септическим шоком и летальным исходом. Было показано, что *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus sanguis* и *Staphylococcus epidermidis* могут служить триггером повышения экспрессии VCAM-1 и

ICAM-1 на поверхности эндотелиальных клеток, что приводит к адгезии моноцитов к эндотелию [33]. Адгезия моноцитов к поверхностям, покрытым ICAM-1, может подавляться с помощью CXCL12 посредством LYN-киназы [19].

Заключение

Результаты проведенного исследования показывают, что нативные клапаны сердца, пораженные ИЭ, характеризуются уникальным цитокиновым профилем по сравнению с клапанами, полученными от пациентов с неинфекционной патологией эндокарда. В пораженных ИЭ нативных клапанах сердца отмечается неспецифическое локальное воспаление, активная

неоваскуляризация и снижение резистентности к патогенной бактериемии. Полученные результаты могут способствовать лучшему пониманию фундаментальных механизмов патогенеза ИЭ и сигнальных путей, лежащих в основе этой патологии.

Соблюдение этических стандартов

Исследование выполнено в соответствии со стандартами надлежащей клинической практики (Good Clinical Practice) и принципами Хельсинкской декларации. Протокол исследования одобрен локальным этическим комитетом ФГБНУ НИИ КПССЗ. До включения в исследование у всех участников получено добровольное письменное информированное согласие.

Список литературы / References

1. Завырылина И.Н., Барбараш Н.А., Начева Л.В. Паразитарные поражения сердца // Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний, 2012. № 2. С.60-63. [Zavyrylina I.N., Barbarash N.A., Nacheva L.V. The parasitic heart lesions. *Kompleksnyye problemy serdechno-sosudistykh zabolevaniy = Complex Issues of Cardiovascular Diseases*, 2012, no. 2, pp. 60-63. (In Russ.)]
2. Синицкий М.Ю., Асанов М.А., Тхоренко Б.А., Одаренко Ю.Н., Понасенко А.В. Микрофлора периферической крови пациентов с инфекционным эндокардитом // Клиническая лабораторная диагностика, 2018. Т. 63, № 10. С. 636-640. [Sinitsky M.Y., Asanov M.A., Tkhorenko B.A., Odarenko Y.N., Ponasenko A.V. Microflora of peripheral blood obtained from patients with infective endocarditis. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika = Russian Clinical Laboratory Diagnostics*, 2018, Vol. 63, no. 10, pp. 636-640. (In Russ.)]
3. Appay V., Rowland-Jones S.L. RANTES: a versatile and controversial chemokine. *Trends Immunol.*, 2001, Vol. 22, no. 2, pp. 83-87.
4. Araújo I.R., Ferrari T.C., Teixeira-Carvalho A., Campi-Azevedo A.C., Rodrigues L.V., Guimarães Júnior M.H., Barros T.L., Gelape C.L., Sousa G.R., Nunes M.C. Cytokine signature in infective endocarditis. *PLoS One*, 2015, Vol. 10, no. 7, e0133631. doi: 10.1371/journal.pone.0133631.
5. Arend W.P. The balance between IL-1 and IL-1Ra in disease. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 2002, Vol. 13, no. 4-5, pp. 323-340.
6. Baddour L.M., Wilson W.R., Bayer A.S., Fowler V.G., Tleyjeh I.M., Rybak M.J., Barsic B., Lockhart P.B., Gewitz M.H., Levison M.E., Bolger A.F., Steckelberg J.M., Baltimore R.S., Fink A.M., O'Gara P., Taubert K.A. Infective endocarditis in adults: diagnosis, antimicrobial therapy, and management of complications: a scientific statement for healthcare professionals from the American Heart Association. *Circulation*, 2015, Vol. 132, no. 15, pp. 1435-1486.
7. Bone R.C. Modulators of coagulation. A critical appraisal of their role in sepsis. *Arch. Intern. Med.*, 1992, Vol. 152, no. 7, pp. 1381-1389.
8. Bustamante J., Arévalo A., Tamayo E., Sarria C., Aguilar-Blanco E.M., Heredia M., Almansa R., Rico L., Iglesias V., Bermejo-Martin J.F. Cytokine profiles linked to fatal outcome in infective prosthetic valve endocarditis. *APMIS*, 2014, Vol. 122, no. 6, pp. 526-529.
9. Bustin S.A., Benes V., Garson J.A., Hellemans J., Huggett J., Kubista M., Mueller R., Nolan T., Pfaffl M.W., Shipley G.L., Vandesompele J., Wittwer C.T. The MIQE Guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin. Chem.*, 2009, Vol. 55, no. 4, pp. 611-622.
10. Buyukasyk N.S., Ileri M., Alper A., Senen K., Atak R., Hisar I., Yetkin E., Turhan H., Demirkan D. Increased blood coagulation and platelet activation in patients with infective endocarditis and embolic events. *Clin. Cardiol.*, 2004, Vol. 27, no. 3, pp. 154-158.
11. Clark B.C., Krishnan A., McCarter R., Scheel J., Sable C., Beaton A. Using a low-risk population to estimate the specificity of the World Heart Federation criteria for the diagnosis of rheumatic heart disease. *J. Am. Soc. Echocardiogr.*, 2016, Vol. 29, no. 3, pp. 253-258.
12. Diab M., Tasar R., Sponholz C., Lehmann T., Pletz M.W., Bauer M., Brunkhorst F.M., Doenst T. Changes in inflammatory and vasoactive mediator profiles during valvular surgery with or without infective endocarditis: A case control pilot study. *PLoS One*, 2020, Vol. 15, no. 2, e0228286. doi: 10.1371/journal.pone.0228286.

13. Gewitz M.H., Baltimore R.S., Tani L.Y., Sable C.A., Shulman S.T., Carapetis J., Remenyi B., Taubert K.A., Bolger A.F., Beerman L., Mayosi B.M., Beaton A., Pandian N.G., Kaplan E.L. American Heart Association Committee on Rheumatic Fever, Endocarditis, and Kawasaki Disease of the Council on Cardiovascular Disease in the Young, Revision of the Jones criteria for the diagnosis of acute rheumatic fever in the era of doppler echocardiography: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation*, 2015, Vol. 131, no. 20, pp. 1806-1818.
14. Golias C., Batistatou A., Bablekos G., Charalabopoulos A., Peschos D., Mitsopoulos P., Charalabopoulos K. Physiology and pathophysiology of selectins, integrins, and IgSF cell adhesion molecules focusing on inflammation. A paradigm model on infectious endocarditis. *Cell Commun. Adhes.*, 2011, Vol. 18, no. 3, pp. 19-32.
15. Grammer J.B., Eichinger W.B., Bleiziffer S., Benz M.R., Lange R., Bauernschmitt R. Valvular chondromodulin-1 expression is downregulated in a rabbit model of infective endocarditis. *J. Heart Valve Dis.*, 2007, Vol. 16, no. 6, pp. 623-630.
16. Habib G., Lancellotti P., Antunes M.J., Bongioni M.G., Casalta J.P., Del Zotti F., Dulgheru R., El Khoury G., Erba P.A., Iung B., Miro J.M., Mulder B.J., Plonska-Gosciniak E., Price S., Roos-Hesselink J., Snygg-Martin U., Thuny F., Tornos Mas P., Vilacosta I., Zamorano J.L. ESC Scientific Document Group, 2015 ESC Guidelines for the management of infective endocarditis: the Task Force for the Management of Infective Endocarditis of the European Society of Cardiology (ESC). Endorsed by: European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS), the European Association of Nuclear Medicine (EANM). *Eur. Heart J.*, 2015, Vol. 36, no. 44, pp. 3075-3128.
17. Korbecki J., Barczak K., Gutowska I., Chlubek D., Baranowska-Bosiacka I. CXCL1: gene, promoter, regulation of expression, mRNA stability, regulation of activity in the intercellular space. *Int. J. Mol. Sci.*, 2022, Vol. 23, no. 2, 792. doi: 10.3390/ijms23020792.
18. Maghazachi A.A., Al-Aoukaty A., Schall T.J. CC chemokines induce the generation of killer cells from CD56⁺ cells. *Eur. J. Immunol.*, 1996, Vol. 26, no. 2, pp. 315-319.
19. Malik M., Chen Y.Y., Kienzle M.F., Tomkowicz B.E., Collman R.G., Ptasznik A. Monocyte migration and LFA-1-mediated attachment to brain microvascular endothelia is regulated by SDF-1 alpha through Lyn kinase. *J. Immunol.*, 2008, Vol. 181, no. 7, pp. 4632-4637.
20. Marques R.E., Guabiraba R., Russo R.C., Teixeira M.M. Targeting CCL5 in inflammation. *Expert Opin. Ther. Targets*, 2013, Vol. 17, no. 12, pp. 1439-1460.
21. Mathy N.L., Scheuer W., Lanzendörfer M., Honold K., Ambrosius D., Norley S., Kurth R. 2000 Interleukin-16 stimulates the expression and production of pro-inflammatory cytokines by human monocytes. *Immunology*, 2000, Vol. 100, no. 1, pp. 63-69.
22. Maurer M., von Stebut E. Macrophage inflammatory protein-1. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 2004, Vol. 36, no. 10, pp. 1882-1886.
23. Menten P., Wuyts A., Van Damme J. Macrophage inflammatory protein-1. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 2002, Vol. 13, no. 6, pp. 455-481.
24. Perrier S., Darakhshan F., Hajduch E. IL-1 receptor antagonist in metabolic diseases: Dr Jekyll or Mr Hyde? *FEBS Lett.*, 2006, Vol. 580, no. 27, pp. 6289-6294.
25. Prendergast B.D., Tornos P. Surgery for infective endocarditis: who and when? *Circulation*, 2010, Vol. 121, no. 9, pp. 1141-1152.
26. Ris T., Teixeira-Carvalho A., Coelho R.M.P., Brandao-de-Resende C., Gomes M.S., Amaral L.R., Pinto P.H.O.M., Santos L.J.S., Salles J.T., Roos-Hesselink J., Verkaik N., Ferrari T.C.A., Nunes M.C.P. Inflammatory biomarkers in infective endocarditis: machine learning to predict mortality. *Clin. Exp. Immunol.*, 2019, Vol. 196, no. 3, pp. 374-382.
27. Sillen M., Declerck P.J. Targeting PAI-1 in cardiovascular disease: structural insights into PAI-1 functionality and inhibition. *Front. Cardiovasc. Med.*, 2020, Vol. 7, 622473. doi: 10.3389/fcvm.2020.622473.
28. Souza V.H., Visentainer J.E.L., Zacarias J.M.V., Alencar J.B., Tsuneto P.Y., Silva C.O., Salmeron S., Colli C.M., Sell A.M. Association of IL16 polymorphisms with periodontitis in Brazilians: A case-control study. *PLoS One*, 2020, Vol. 15, no. 9, e0239101. doi: 10.1371/journal.pone.0239101.
29. Steckelberg J.M., Murphy J.G., Ballard D., Bailey K., Tajik A.J., Taliercio C.P., Giuliani E.R., Wilson W.R. Emboli in infective endocarditis: the prognostic value of echocardiography. *Ann. Intern. Med.*, 1991, vol.114, no. 8, pp. 635-640.
30. Stewart A.G., Beart P.M. Inflammation: maladies, models, mechanisms and molecules. *Br. J. Pharmacol.*, 2016, Vol. 173, no. 4, pp. 631-634.
31. van Tilborg A.A., Sweep F.C., Geurts-Moespot A.J., Wetzels A.M., de Waal R.M., Westphal J.R., Massuger L.F. Plasminogen activators are involved in angiostatin generation in vivo in benign and malignant ovarian tumor cyst fluids. *Int. J. Oncol.*, 2014, Vol. 44, no. 4, pp. 1394-1400.
32. Vandesompele J., De Preter K., Pattyn F., Poppe B., van Roy N., De Paepe A., Speleman F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.*, 2002, Vol. 3, no. 7, research0034.1. doi: 10.1186/gb-2002-3-7-research0034.

33. Veltrop M.H., Thompson J., Beekhuizen H. Monocytes augment bacterial species- and strain-dependent induction of tissue factor activity in bacterium-infected human vascular endothelial cells. *Infect. Immun.*, 2011, Vol. 69, no. 5, pp. 2797-2807.
34. Weinstock M., Grimm I., Dreier J., Knabbe C., Vollmer T. Genetic variants in genes of the inflammatory response in association with infective endocarditis. *PLoS One*, 2014, Vol. 9, no. 10, e110151. doi: 10.1371/journal.pone.0110151.
35. Wilson C., Purcell C., Seaton A., Oladipo O., Maxwell P.J., O'Sullivan J.M., Wilson R.H., Johnston P.G., Waugh D.J. Chemotherapy-induced CXC-chemokine/CXC-chemokine receptor signaling in metastatic prostate cancer cells confers resistance to oxaliplatin through potentiation of nuclear factor-kappaB transcription and evasion of apoptosis. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 2008, Vol. 327, no. 3, pp. 746-759.
36. Yamauchi R., Tanaka M., Kume N., Minami M., Kawamoto T., Togi K., Shimaoka T., Takahashi S., Yamaguchi J., Nishina T., Kitaichi M., Komeda M., Manabe T., Yonehara S., Kita T. Upregulation of SR-PSOX/CXCL16 and recruitment of CD8⁺ T cells in cardiac valves during inflammatory valvular heart disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2004, Vol. 24, no. 2, pp. 282-287.
37. Yeh C.Y., Shun C.T., Kuo Y.M., Jung C.J., Hsieh S.C., Chiu Y.L., Chen J.W., Hsu R.B., Yang C.J., Chia J.S. Activated human valvular interstitial cells sustain interleukin-17 production to recruit neutrophils in infective endocarditis. *Infect. Immun.*, 2015, Vol. 83, no. 6, pp. 2202-2212.

Авторы:

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

Синицкий М.Ю. — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории геномной медицины отдела экспериментальной медицины ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», г. Кемерово, Россия

Казачек Я.В. — к.м.н., главный фармаколог ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», г. Кемерово, Россия

Евтушенко А.В. — д.м.н., заведующий лабораторией пороков сердца ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», г. Кемерово, Россия

Хуторная М.В. — младший научный сотрудник лаборатории геномной медицины отдела экспериментальной медицины ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», г. Кемерово, Россия

Authors:

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

Sinitsky M. Yu., PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Genomic Medicine, Department of Experimental Medicine, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation

Kazachek Ya.V., PhD (Medicine), Chief Pharmacologist, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation

Evtushenko A.V., PhD, MD (Medicine), Head, Laboratory of Heart Diseases, Department of heart and vascular surgery, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation

Khutornaya M.V., Junior Research Associate, Laboratory of Genomic Medicine, Department of Experimental Medicine, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation

Асанов М.А. — младший научный сотрудник лаборатории геномной медицины отдела экспериментальной медицины ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», г. Кемерово, Россия

Поддубняк А.О. — лаборант-исследователь лаборатории геномной медицины отдела экспериментальной медицины ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», г. Кемерово, Россия

Понасенко А.В. — к.м.н., заведующая лабораторией геномной медицины отдела экспериментальной медицины ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», г. Кемерово, Россия

Asanov M.A., Junior Research Associate, Laboratory of Genomic Medicine, Department of Experimental Medicine, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation

Poddubnyak A.O., Research Laboratory Assistant, Laboratory of Genomic Medicine, Department of Experimental Medicine, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation

Ponassenko A.V., PhD (Medicine), Head, Laboratory of Genomic Medicine, Department of Experimental Medicine, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation

Поступила 16.05.2023

Отправлена на доработку 26.06.2023

Принята к печати 04.10.2023

Received 16.05.2023

Revision received 26.06.2023

Accepted 04.10.2023