

ISSN 1563-0625 (print)
ISSN 2313-741X (online)

Том 24, № 2. С. 211-426

2022

Официальный журнал
Санкт-Петербургского Регионального Отделения
Российской Ассоциации
Аллергологов и Клинических Иммунологов

МЕДИЦИНСКАЯ ИММУНОЛОГИЯ



ТАКЗАЙРО ДАЕТ ВОЗМОЖНОСТЬ ИЗБЕЖАТЬ АТАК НАО, ПОЗВОЛЯЯ ПАЦИЕНТУ ВЕСТИ НОРМАЛЬНЫЙ ОБРАЗ ЖИЗНИ

Профилактика приступов с применением 1 подкожной инъекции для самостоятельного введения каждые 2 недели¹



87%

ОТНОСИТЕЛЬНОЕ СНИЖЕНИЕ ЧАСТОТЫ ПРИСТУПОВ
($p < 0,001$)

Рекомендуемая начальная доза 300 мг каждые 2 недели. При стабильном отсутствии приступов на фоне терапии можно рассматривать сокращение дозы на 300 мг каждые четыре недели, особенно у пациентов с низким весом. ТАКЗАЙРО показан для профилактики рецидивирующих приступов наследственного ангиоотека (НАО) у пациентов в возрасте 12 лет и старше.¹

ТАКЗАЙРО может вводиться пациентом самостоятельно или опекуном только после обучения врачом технике подкожной инъекции¹

7
В
РАЗ ВЫШЕ
ВЫШЕ КАЧЕСТВО ЖИЗНИ
У ПАЦИЕНТОВ⁴
по сравнению с плацебо



КАЖДЫЕ
2
НЕДЕЛИ
инъекция



3
ВАРИАНТА
МЕСТА ИНЪЕКЦИИ:
абдоминальная зона,
зона бедра или зона плеч



¹ В клинических исследованиях инъекция для самостоятельного введения ТАКЗАЙРО у большинства пациентов занимала от 10 до 60 секунд.¹

1. TAKHZYRO (lanadelumab) Summary of Product Characteristics. November 2018. 2. TAKHZYRO (lanadelumab-lyo) [prescribing information]. Lexington, MA: Shire LLC; 2018. 3. Инструкция по медицинскому применению. Такзайро. https://rfa.ossmir.ru/rfa_View_v2.aspx?routeId=-d5ba11a-2b2e-4c6d-4b06-c11b6a71b163&=- Регистрационный номер: ЛП-006876. **Международное непатентованное название:** ланделумаб. **Лекарственная форма:** порошок для подкожного введения. **Фармакотерапевтическая группа:** наследственный ангионевротический отек (НАО) средство лечения. **Фармакологические свойства.** Ланделумаб представляет собой полностью человеческое моноклональное антитело (иммуноглобулин G1 (IgG1) / γ -легкая цепь), при производстве которого используется технология рекомбинантной ДНК в клетках яичников китайских хомячков (CHO). Ланделумаб ингибирует протеолитическую активность активированного калликреина в плазме. Повышение активности калликреина в плазме вызывает приступ ангионевротического отека у пациентов с НАО с последующим образованием расшищенного кинингена из высокой молекулярной массы (Bosch High Molecular Weight Kininogen, (HMKW). Ланделумаб обеспечивает длительный контроль активности калликреина в плазме и тем самым ограничивает образование брадикинина у пациентов с НАО. **Фармакодинамика:** зависимость от концентрации препарата Такзайро степень ингибирования калликреина в плазме, измеренная как снижение концентрации cHMKW, была продемонстрирована после подкожного введения препарата в дозе 150 мг 1 раз в 4 недели (1 раз/4 нед), 300 мг 1 раз в 4 недели (1 раз/4 нед) или 300 мг 1 раз в 2 недели (1 раз/2 нед) пациентам с НАО. **Клиническая эффективность и безопасность.** Эффективность и безопасность ланделумаба подтверждены, главным образом, результатами исследования HEU, которое представляло собой многоцентровое рандомизированное двойное слепое плацебо-контролируемое исследование в параллельных группах с участием 125 пациентов (115 взрослых и 10 подростков) с НАО I или II типа. Среднее снижение частоты атак НАО было стабильно выше в группах терапии препаратом Такзайро по сравнению с группой плацебо, независимо от указания в анамнезе на длительную профилактическую терапию, наличия варикозных атак или их частоты во время вводного периода. Доля пациентов, у которых отсутствовали приступы в течение последних 16 недель исследования (со дня 70 до дня 182), составила 77% в группе лечения препаратом в дозе 300 мг 1 раз/2 нед по сравнению с 3% пациентов в группе плацебо. 100% пациентов, получавших препарат в дозе 300 мг 1 раз/2 нед или 1 раз/4 нед, и 89% пациентов, получавших препарат в дозе 150 мг 1 раз/4 нед, достигли как минимум 50% снижения частоты приступов НАО по сравнению с вводным периодом. Во всех группах терапии препаратом Такзайро наблюдалось улучшение общей оценки с помощью вопроса «Качество жизни» у пациентов с ангионевротическим отеком (AE-QoL). Длительную безопасность и эффективность профилактической терапии препаратом Такзайро для предотвращения приступов НАО оценивали в открытом проспективном исследовании HEU. **Показания к применению:** препарат Такзайро показан для профилактики рецидивирующих приступов наследственного ангионевротического отека у пациентов в возрасте 12 лет и старше. **Противопоказания:** повышенная чувствительность к ланделуму или любому из вспомогательных веществ, детский возраст до 12 лет (недостаточно клинических данных), беременность и период грудного вскармливания. **Применение при беременности и в период грудного вскармливания.** Беременность. Данные о применении ланделумаба у беременных женщин либо отсутствуют, либо крайне ограничены. Исследования, проведенные на животных, не выявили прямого или косвенного токсического влияния препарата на репродуктивную функцию и развитие плода. В исследованиях пренатально-постнатальному развитию у беременных яванских макаков с использованием примерно в 32 раза выше, чем после введения препарата ланделумаба в дозе 300 мг 1 раз/2 нед в пересчете на АЧС. В качестве меры предосторожности рекомендуется избегать применения ланделумаба во время беременности. **Период грудного вскармливания:** отсутствуют данные о выделении ланделумаба в грудное молоко. **Восприимчивость.** Оценка влияния ланделумаба на фертильность человека не проводилась. Установлено, что ланделумаб не оказывал влияния на фертильность самцов и самок яванских макаков. **Способ применения и дозы.** Только для подкожного введения. Каждый флакон препарата Такзайро предназначен только для однократного применения. Препарат необходимо вводить только в рекомендованные области: живот, бедро и верхнюю наружную часть плеча (см. раздел «Фармакокинетика»). Рекомендуется чередовать области проведения инъекции. Перед введением препарата необходимо проверить внешний вид каждого флакона. Раствор должен быть прозрачным или слегка желтоватым. Если раствор изменил окраску или содержит посторонние включения, его нельзя использовать. Следует избегать энергичного перемешивания. **Взрослые.** Применение препарата Такзайро необходимо начинать под наблюдением врача, имеющего опыт лечения пациентов с НАО. Препарат Такзайро может вводить сам пациент или лиц, осуществляющее уход за ним, после обучения правильной технике подкожных инъекций медицинскими работниками (см. подраздел «Инструкция по применению препарата»). **Режим дозирования.** Рекомендуемая начальная доза составляет 300 мг ланделумаба (препарата Такзайро) 1 раз/2 нед. Пациентам, у которых на фоне терапии стабильно отсутствуют приступы,

доза ланделумаба может быть снижена до 300 мг 1 раз/4 нед, особенно пациентам с низкой массой тела. Препарат Такзайро не предназначен для лечения острых приступов НАО (см. раздел «Особые указания»). **Введение пропущенной дозы препарата:** следует особо обратить внимание, что, если введение очередной дозы препарата Такзайро пропущено, ее следует ввести как можно скорее, однако так, чтобы интервал между дозами был не менее 10 суток. **Пожилые.** Ожидается, что возраст пациента не будет влиять на экспозицию ланделумаба. Не требуется корректировать дозу препарата у пациентов старше 65 лет. **Применение у пациентов с печеночной недостаточностью.** Не проводилось исследования препарата у пациентов с печеночной недостаточностью. Предполагается, что печеночная недостаточность не влияет на экспозицию ланделумаба или его профиль безопасности. **Дети:** в связи с отсутствием данных безопасность и эффективность препарата Такзайро у детей младше 12 лет не установлены. **Побочные действия.** Наиболее частыми (52,4%) нежелательными лекарственными реакциями (НЛР), ассоциированными с введением препарата Такзайро, были реакции в месте введения, в том числе боль, эритема и кровоподтек в месте введения. Из этих локальных НЛР 97% были слабой степени тяжести, а 90% разрешились в течение 1 суток (средняя продолжительность локальной НЛР составила 6 минут). Реакции гиперчувствительности (зуд, легкая и средней степени тяжести, дискомфорт и ощущение покалывания языка) отмечались у 1,2% пациентов (см. раздел «Особые указания»). **Дети.** Безопасность применения препарата Такзайро оценивали в подгруппе из 23 пациентов в возрасте от 12 до 18 лет. Результаты анализа в подгруппе соответствовали результатам анализа данных всех пациентов. **Иммуногенность.** Терапия ланделумом ассоциировалась с выработкой антител к препарату у 11,9% (10/84) пациентов. У всех пациентов титры антител были низкими. У 20% (17/10) пациентов присутствие антител в крови было кратковременным. Нейтрализующие антитела к ланделуму были обнаружены у 2,4% (2/84) пациентов, получавших лечение препаратом Такзайро. Выработка антител к ланделуму, в том числе нейтрализующих антител, не оказывала неблагоприятного влияния на профиль фармакокинетики и фармакодинамики препарата или на его клинический ответ. Перечень всех побочных эффектов представлен в инструкции по медицинскому применению. **Передозировка.** Случаев передозировки не зарегистрировано. Доступная информация для идентификации признаков и симптомов передозировки отсутствует. В случае появления симптомов рекомендуется проводить симптоматическую терапию. Доступный антидот отсутствует. **Взаимодействие с другими лекарственными средствами.** Не проводилось исследований лекарственного взаимодействия. Сопутствующее применение ингибитора С1 эстеразы в качестве неотложной терапии оказывает аддитивное действие на индуцированный ланделумом cHMKW-ответ. **Особые указания.** **Проклеиваемость.** С целью улучшения проклеиваемости применения биологических лекарственных средств необходимо точно регистрировать название и номер серии применяемого лекарственного препарата. **Реакции гиперчувствительности:** были отмечены реакции гиперчувствительности. В случае развития тяжелой реакции гиперчувствительности необходимо немедленно прекратить введение препарата Такзайро и начать соответствующую терапию. **Общие указания.** Препарат Такзайро не предназначен для лечения острых приступов НАО. В случае развития острого приступа НАО необходимо начать индивидуально подобранную неотложную терапию другими зарегистрированными препаратами. Клинические данные о применении ланделумаба у пациентов с НАО и нормальной активностью C-ингибитора отсутствуют. **Влияние на показатели свертывающей системы крови.** Ланделумаб может повышать значения активированного частичного тромбопластинного времени (АЧТВ) в результате взаимодействия ланделумаба с методом определения АЧТВ. Реактивы, применяемые для определения АЧТВ, инициируют внутренний путь коагуляции посредством активации плазменного калликреина в контактной системе. Ингибирование плазменного калликреина ланделумом может увеличить АЧТВ, определенное с помощью этого метода. Ни одно из повышений АЧТВ у пациентов, получавших препарат Такзайро, не ассоциировалось с патологическим кровотечением. Не наблюдалось различий в значениях международного нормализованного отношения (МНО) между группами терапии. **Содержание натрия:** лекарственный препарат Такзайро содержит менее 1 ммоль натрия (23 мг) на один флакон, то есть фактически является препаратом, не содержащим натрия. **Влияние на способность управления транспортными средствами, механизмами:** препарат Такзайро не обладает каким-либо значимым влиянием на способность к управлению транспортными средствами и механизмами. **Условия отпуска:** отпускается по рецепту. **Претензии потребителей направлять по адресу:** ООО «Такеда Фармасьютикалс», 119048, г. Москва, ул. Усачева, д. 2, стр. 1, телефон: +7 (495) 933 55 11, факс: +7 (495) 502 16 25. Полная информация по препарату представлена в инструкции по медицинскому применению препарата (ИМП). Настоящая сокращенная инструкция по применению (СИП) представлена исключительно в информационных целях и не может служить в качестве исчерпывающего руководства при назначении и применении препарата.



ООО «Такеда Фармасьютикалс»: ул. Усачева, 2, стр. 1, 119048, Москва, Россия
Тел.: (495) 933 5511, факс: (495) 502 1625
www.takeda.com.ru

ТАКЗАЙРО
подкожная инъекция ланделумаба

**НОВЫЙ ПОДХОД
В ПРОФИЛАКТИКЕ**

САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКОЕ РЕГИОНАЛЬНОЕ ОТДЕЛЕНИЕ
РОССИЙСКОЙ АССОЦИАЦИИ АЛЛЕРГОЛОГОВ И КЛИНИЧЕСКИХ ИММУНОЛОГОВ
(СПб РО РААКИ)

МЕДИЦИНСКАЯ ИММУНОЛОГИЯ

март-апрель

2022, том 24

№ 2

Основан в марте 1999 года

Главный редактор

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

Заместитель главного редактора

Тотоян Арег Артемович – доктор медицинских наук, профессор, академик РАН, директор Санкт-Петербургского НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, заведующий лабораторией молекулярной иммунологии и сероэпидемиологии, Санкт-Петербург, Россия

Редакционная коллегия

Горячкина Людмила Александровна – доктор медицинских наук, профессор, заведующая кафедрой клинической аллергологии Российской медицинской академии последипломного образования Минздрава России, Москва, Россия

Кашкин Кирилл Павлович – доктор медицинских наук, профессор, академик РАН, заведующий кафедрой иммунологии Российской медицинской академии последипломного образования Минздрава России, Москва, Россия

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

Мазуров Вадим Иванович – доктор медицинских наук, профессор, академик РАН, президент Северо-Западного государственного медицинского университета имени И.И. Мечникова Минздрава России, заведующий кафедрой терапии и ревматологии имени Э.Э. Эйхвальда, Санкт-Петербург, Россия

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

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

Ответственный секретарь:

Ракитянская Н.В.

E-mail: medimmun@spbraaci.ru

Редактор перевода:

д.м.н. Чухловин А.Б.

Редактор электронной версии:

Ерофеева В.С.

Редакция: тел./факс (812) 233-08-58

Адрес для корреспонденции:

197101, Санкт-Петербург, а/я 130.

Электронная версия: www.mimmun.ru; www.elibrary.ru

© Медицинская иммунология

Журнал зарегистрирован Северо-Западным региональным управлением Государственного комитета РФ по печати 26 марта 1999 г.

Свидетельство о регистрации № П 3612.

Министерством РФ по делам печати, телерадиовещания и средств массовых коммуникаций 30 июня 2003 г.

Свидетельство о регистрации ПИ № 77-15892.

Федеральной службой по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций (Роскомнадзор)

Свидетельство о регистрации средства массовой информации ПИ №ФС77-60436 30 декабря 2014 г.

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 11.04.2022 г. Формат 60 x 90 1/8. Печать офсетная.

Усл. печ. л. 26,25. Тираж 2000 экз. (1-й завод – 1000 экз.) Заказ № 026

Напечатано в ООО «АРТЕМИДА».

199178, Санкт-Петербург, 8-я линия В.О., 83, корп. 1, Литер А

Тел.: (812) 950-10-99.

Пинегин Борис Владимирович – доктор медицинских наук, профессор, руководитель отдела иммунодиагностики и иммунокоррекции ГНЦ Институт иммунологии ФМБА России, Москва, Россия

Симбирцев Андрей Семенович – доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН, научный руководитель Государственного НИИ особо чистых биопрепаратов ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия

Смирнов Вячеслав Сергеевич – доктор медицинских наук, профессор, научный руководитель Медико-биологического научно-производственного комплекса «Цитомед», Санкт-Петербург, Россия

Хаитов Рахим Мусаевич – доктор медицинских наук, профессор, заслуженный деятель науки РФ, академик РАН, научный руководитель ГНЦ Институт иммунологии ФМБА России, Москва, Россия

Черных Елена Рэмовна – доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН, заместитель директора по научной работе НИИ фундаментальной и клинической иммунологии Сибирского отделения РАН, заведующая лабораторией клеточной иммунотерапии, Новосибирск, Россия

Редакционный совет

Ласунская Елена – доктор медицинских наук, профессор, Государственный университет Северной Флориды, Лаборатория биологии распознавания, Рио-де-Жанейро, Бразилия

Мароди Ласло – доктор медицинских наук, профессор, Университет Дебрецена, Медицинский научный центр, Отдел инфекционной и педиатрической иммунологии, Дебрецен, Венгрия

Михалек Ярослав – доктор медицинских наук, Университет города Брно, заведующий кафедрой фармакологии медицинского факультета, Брно, Чехия

Роггенбук Дирк – доктор медицинских наук, профессор, Университет Лаузиц «University of Applied Sciences», Зенфтенберг, Германия

Сеонг Сеунг-Йонг – доктор медицинских наук, Национальный Университет, руководитель кафедры микробиологии и иммунологии, Сеул, Корея

Тендлер Евгений – доктор медицинских наук, Медицинский центр Рамбам, Отдел клинической биохимии, Хайфа, Израиль

Фейст Евгений – доктор медицинских наук, Университет Гумбольдта, клиника «Шарите», руководитель отделения ревматологии и клинической иммунологии, Берлин, Германия

Халдосяниди Софья – доктор медицинских наук, профессор, Институт молекулярных исследований, Сан-Диего, Калифорния, США

С 2001 года журнал «Медицинская иммунология» регулярно входит в «Перечень ведущих рецензируемых научных журналов и изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертации на соискание ученой степени доктора наук», рекомендованных ВАК Министерства образования и науки РФ.

С 2016 года журнал «Медицинская иммунология» включен в международную базу SCOPUS.

RUSSIAN ASSOCIATION OF ALLERGOLOGISTS AND CLINICAL IMMUNOLOGISTS,
ST. PETERSBURG REGIONAL BRANCH
(SPb RAACI)

MEDICAL IMMUNOLOGY/ MEDITSINSKAYA IMMUNOLOGIYA

March-April

2022, volume 24

No. 2

Published since March 1999

Editor-in-Chief

Irina S. Freidlin – PhD, MD, Professor, RAS corresponding member, Institute of Experimental Medicine, Department of Immunology, Chief researcher, St. Petersburg, Russian Federation

Deputy Editor-in-Chief

Areg A. Totolian – PhD, MD, Professor, RAS full member, St. Petersburg Pasteur Institute of Epidemiology and Microbiology, Director, Laboratory of Molecular Immunology and Seroepidemiology, Chief, St. Petersburg, Russian Federation

Editorial Board

Ludmila A. Goriachkina – PhD, MD, Russian Academy of Postgraduate Medical Education, Department of Clinical Allergology, Chief, Moscow, Russian Federation

Kirill P. Kashkin – PhD, MD, Professor, RAS full member, Russian Academy of Postgraduate Medical Education, Department of Immunology, Chief, Moscow, Russian Federation

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

Vadim I. Mazurov – PhD, MD, Professor, RAS full member, Nord-Western State Medical University, President, Department of Therapy and Rheumatology, Chief, St. Petersburg, Russian Federation

Alexander V. Karaulov – PhD, MD, Professor, RAS full member, I. Sechenov First Moscow State Medical University, Department of Clinical Immunology and Allergology, Chief, Moscow, Russia

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

Managing Editor:

Natalia Rakitianskaia
E-mail: medimmun@spbraaci.ru

Translation editor:

Alexey B. Chukhlov, PhD, MD

Online version editorial manager:

Erofeeva V.S.

Editorial Office: phone/fax +7 812 233-08-58

Address for correspondence:

197101, St. Petersburg, P.O. Box 130.

Electronic version: www.mimmun.ru; www.elibrary.ru

© Medical Immunology

The Journal is registered at the North Western Regional Administration for the Press Affairs of the Russian Federation, March 26, 1999.

Certificate of registration PI № 77-15892

by the Ministry of Press, Television,

Broadcasting and Mass media of the Russian Federation, June 30, 2003.

Federal Service for Supervision of Communications, Information Technology and Mass Media (ROSKOMNADZOR)

Certificate on registration of mass media PI №FS77-60436, December 30, 2014

Chelovek Publishing House

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

E-mail: mail@mirmed.ru

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

Passed for printing 11.04.2022. Print format 60 x 90 1/8. Offset printing.

Printed sheets 26.25. Circulation 2000 copies. (1st edition – 1000 copies.)

Print in LLC «ARTEMIDA»

199178, Russian Federation, St. Petersburg, 8 line of Vasilievsky Island, 83/1-A

Phone: (812) 950-10-99

Since 2001, the Medical Immunology Journal is admitted to the Index of leading peer-reviewed scientific Journals intended for publication of key research results of MD Theses, as recommended by the Higher Attestation Commission of the Russian Ministry of Education and Science.

Since 2016, the Medical Immunology Journal is included into international SCOPUS database.

Boris V. Pinegin – PhD, MD, Professor, Institute of Immunology, Department of Immunodiagnostics and Immunotherapy, Chief, Moscow, Russian Federation

Andrei S. Simbirtsev – PhD, MD, Professor, RAS corresponding member, St. Petersburg Institute of Pure Biochemicals, Scientific Director, St. Petersburg, Russian Federation

Viacheslav S. Smirnov – PhD, MD, Professor, "Cytomed" Ltd., Director on Science, St. Petersburg, Russian Federation

Rahim M. Khaitov – PhD, MD, Professor, RAS full member, Institute of Immunology, Scientific Director, Moscow, Russian Federation

Elena R. Chernykh – PhD, MD, Professor, RAS corresponding member, Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Deputy-director on Science, Laboratory of Cellular Immunotherapy, Chief, Novosibirsk, Russian Federation

Editorial Council

Eugen Feist – PD, MD, Department of Rheumatology and Clinical Immunology, Charité – Universitätsmedizin Berlin, Free University and Humboldt University of Berlin, Berlin, Germany

Sophia Khaldoyanidi – PhD, MD, Associate Member, Torrey Pines Institute for Molecular Studies, San Diego, CA, USA

Elena Lasunskaja – PhD, MD, Associated Professor, Laboratory of Biology of Recognition, Universidade Estadual do Norte Fluminense, Rio de Janeiro, Brazil

László Maródi – PhD, MD, Professor, Department of Infectious and Pediatric Immunology, University of Debrecen Medical and Health Science Centre, Debrecen, Hungary

Jaroslav Michálek – PhD, MD, Faculty of Medicine, Department of Pharmacology, Masaryk University, Brno, Czech Republic

Dirk Roggenbuck – PhD, MD, Professor, Lausitz University of Applied Sciences, Senftenberg, Germany

Seung-Yong Seong – PhD, MD, Seoul National University, Associate Dean for Planning, Department of Microbiology and Immunology, Chief, Seoul, South Korea

Yevgeny Tendler – PhD, MD, Department of Clinical Biochemistry, Rambam Medical Center, Haifa, Israel

СОДЕРЖАНИЕ

Обзоры

Бурова Л.А., Суворов А.Н., Тотолян Артем А.

STREPTOCOCCUS PYOGENES: ФЕНОМЕН НЕИММУННОГО СВЯЗЫВАНИЯ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ ЧЕЛОВЕКА И ЕГО РОЛЬ В ПАТОЛОГИИ217

Бычкова Н.В.

ЛЕКАРСТВЕННАЯ ГИПЕРЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ: МЕХАНИЗМЫ ФОРМИРОВАНИЯ И ВОЗМОЖНОСТИ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ235

Оригинальные статьи

Скупневский С.В., Пухаева Е.Г., Бадриев А.К., Руруа Ф.К., Батагова Ф.Э., Фарниева Ж.Г.

МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ЛИМФОЦИТОВ В УСЛОВИЯХ СРЫВА ИММУННОЙ ТОЛЕРАНТНОСТИ У КРЫС247

Годовалов А.П., Карпунина Т.И.

ВЛИЯНИЕ ПОЛИАМИНОВ БАКТЕРИАЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ НА ПРОДУКЦИЮ КЛЮЧЕВЫХ ЦИТОКИНОВ В КУЛЬТУРЕ МОНОНУКЛЕАРНЫХ ЛЕЙКОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА257

Байкенова М.Б., Соколова К.В., Гетте И.Ф., Данилова И.Г.

РОЛЬ ЛЕЙКОЦИТОВ В ПОВРЕЖДЕНИИ ПЕЧЕНИ ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ САХАРНОГО ДИАБЕТА 1 И 2 ТИПА263

Топчиева Л.В., Корнева В.А., Малышева И.Е.

УРОВЕНЬ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ FOXP3, IL2R, CD8A, ROR γ В ЛЕЙКОЦИТАХ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ЗДОРОВЫХ ЛЮДЕЙ И ПАЦИЕНТОВ С АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИЕЙ273

Долгушин И.И., Генкель В.В., Батурина И.Л., Савочкина А.Ю., Минасова А.А., Никушкина К.В., Пыхова Л.Р., Кузнецова А.С., Шапошник И.И.

ВЗАИМОСВЯЗИ ИММУНОСУПРЕССОРНЫХ НЕЙТРОФИЛОВ И ПОКАЗАТЕЛЕЙ ВРОЖДЕННОГО И АДАПТИВНОГО ИММУНИТЕТА У ПАЦИЕНТОВ С СУБКЛИНИЧЕСКИМ АТЕРОСКЛЕРОЗОМ283

Османов Р.Э., Фабрикантов О.Л.

АССОЦИАЦИЯ СИСТЕМНОГО КЛЕТОЧНОГО ИММУНИТЕТА С РАЗВИТИЕМ КАТАРАКТЫ295

Агарков Н.М., Фабрикантов О.Л., Лев И.В., Николашин С.И., Аксенов В.В.

ОСОБЕННОСТИ СИСТЕМЫ КОМПЛЕМЕНТА ПРИ ПЕРВИЧНОЙ ОТКРЫТОУГОЛЬНОЙ ГЛАУКОМЕ И СИНДРОМЕ СУХОГО ГЛАЗА У ПОЖИЛЫХ301

Фабрикантов О.Л., Османов Р.Э.

СИСТЕМНЫЙ ИНТЕРЛЕЙКИНОВЫЙ ПРОФИЛЬ ПАЦИЕНТОВ ПОЖИЛОГО ВОЗРАСТА С КАТАРАКТой, СОЧЕТАННОЙ С СИНДРОМОМ СТАРЧЕСКОЙ АСТЕНИИ309

Ковязина Н.А., Алхутлова Н.А., Камеев А.В., Трусова О.В., Жижина О.Л., Егорова М.О.

ОЦЕНКА ИНФОРМАТИВНОСТИ ИССЛЕДОВАНИЯ УРОВНЯ СПЕЦИФИЧЕСКИХ IgE К АЛЛЕРГЕНУ ЦЕЛЬНОГО КОРОВЬЕГО МОЛОКА И ЕГО КОМПОНЕНТАМ, А ТАКЖЕ К СОЕ И КЛЕЙКОВИНЕ У ДЕТЕЙ317

Ярмолинская М.И., Дурнева Е.И., Маркова К.Л., Михайлова В.А., Сельков С.А., Соколов Д.И.

МИКРОВЕЗИКУЛЫ ЛЕЙКОЦИТАРНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ В ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПАЦИЕНТОК С НАРУЖНЫМ ГЕНИТАЛЬНЫМ ЭНДОМЕТРИОЗОМ327

Семенова Е.В., Павлюк В.В., Уварова М.А., Иванов А.В.

ОСОБЕННОСТИ ГУМОРАЛЬНОГО ИММУНИТЕТА ПОСЛЕ ПЕРЕНЕСЕННОГО COVID-19337

Долгушина Н.В., Менжинская И.В., Безнощенко О.С., Муллабаева С.М., Городнова Е.А., Кречетова Л.В.

ПРОФИЛЬ АНТИФОСФОЛИПИДНЫХ АНТИТЕЛ И СОСТОЯНИЕ СИСТЕМЫ КОМПЛЕМЕНТА У БОЛЬНЫХ COVID-19 РАЗНОЙ СТЕПЕНИ ТЯЖЕСТИ351

Сизякина Л.П., Андреева И.И., Харитонов 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-19367

Давыдова Е.В., Осиков М.В., Кайгородцева Н.В.

ДИНАМИКА ИММУННЫХ ИЗМЕНЕНИЙ В ОЧАГЕ ПОВРЕЖДЕНИЯ ПРИ ОКСАЗОЛОН-ИНДУЦИРОВАННОМ ЯЗВЕННОМ КОЛИТЕ НА ФОНЕ ОЗОНОТЕРАПИИ379

Краткие сообщения

Кологривова И.В., Суслова Т.Е., Кошельская О.А., Ребенкова М.С., Харитонов О.А., Дымбрылова О.Н., Андреев С.Л.

МАКРОФАГИ В ЭПИКАРДИАЛЬНОЙ ЖИРОВОЙ ТКАНИ И СЫВОРОТОЧНЫЙ NT-proBNP У ПАЦИЕНТОВ СО СТАБИЛЬНОЙ ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ СЕРДЦА389

Бережанский П.В., Татаурщикова Н.С.

МИКРОЦИРКУЛЯТОРНЫЕ И ВЕГЕТОСОСУДИСТЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ У ДЕТЕЙ С АЛЛЕРГИЧЕСКИМ РИНИТОМ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СРЕДЫ ПРОЖИВАНИЯ395

Кибалина И.В., Цыбиков Н.Н., Фефелова Е.В.

ДИНАМИКА УРОВНЯ ХЕМОКИНА ENA-78/CXCL5 В СЫВОРОТКЕ КРОВИ И КОЖНОМ ЭКССУДАТЕ У ПАЦИЕНТОВ С АТОПИЧЕСКИМ ДЕРМАТИТОМ401

Куртасова Л.М., Лубнина Т.В., Сафонцева Е.В.

ИЗМЕНЕНИЯ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ НЕЙТРОФИЛОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У ДЕТЕЙ РАННЕГО ВОЗРАСТА С РЕЦИДИВИРУЮЩЕЙ РЕСПИРАТОРНОЙ ИНФЕКЦИЕЙ407

Андрюсова Л.В., Симашкова Н.В., Шушпанова О.В., Отман И.Н., Зозуля С.А., Шушпанова Т.В., Ключник Т.П.

ПОКАЗАТЕЛИ ВРОЖДЕННОГО И ПРИОБРЕТЕННОГО ИММУНИТЕТА В ОЦЕНКЕ ТЯЖЕСТИ КЛИНИЧЕСКОГО СОСТОЯНИЯ ПАЦИЕНТОВ С ДЕТСКОЙ ШИЗОФРЕНИЕЙ413

Дневник иммунолога419

Некролог421

Правила для авторов423

Авторский указатель426

Предметный указатель426

CONTENTS

Reviews

Burova L.A., Suvorov A.N., Totolian Artem A.

STREPTOCOCCUS PYOGENES: PHENOMENON OF NONIMMUNE BINDING OF HUMAN IMMUNOGLOBULINS AND ITS ROLE IN PATHOLOGY	217
---	-----

Bychkova N.V.

DRUG HYPERSENSITIVITY: MECHANISMS AND OPPORTUNITIES OF LABORATORY DIAGNOSTICS	235
--	-----

Original articles

Skupnevsky S.V., Pukhaeva E.G., Badtiev A.K., Rurua F.K., Batagova F.E., Farnieva Z.G.

METABOLIC CHANGES OF LYMPHOCYTES IN A RAT MODEL OF AUTOIMMUNITY	247
--	-----

Godovalov A.P., Karpunina T.I.

INFLUENCE OF POLYAMINES OF BACTERIAL ORIGIN ON THE PRODUCTION OF KEY CYTOKINES IN THE CULTURE OF HUMAN MONONUCLEAR LEUKOCYTES	257
--	-----

Baykenova M.B., Sokolova K.V., Gette I.F., Danilova I.G.

ROLE OF LEUCOCYTES IN LIVER DAMAGE IN EXPERIMENTAL MODELS OF TYPE 1 AND 2 DIABETES MELLITUS	263
--	-----

Topchieva L.V., Korneva V.A., Malysheva I.E.

FOXP3, IL2R, CD8A AND RORγ GENE EXPRESSION IN PERIPHERAL BLOOD LEUKOCYTES OF HEALTHY PEOPLE AND PATIENTS WITH ARTERIAL HYPERTENSION	273
--	-----

Dolgushin I.I., Genkel V.V., Baturina I.L., Savochkina A.Yu., Minasova A.A., Nikushkina K.V., Pykhova L.R., Kuznetsova A.S., Shaposhnik I.I.

INTERACTIONS BETWEEN IMMUNOSUPPRESSOR NEUTROPHILES, INNATE AND ADAPTIVE IMMUNITY INDEXES IN THE PATIENTS WITH SUBCLINICAL ATHEROSCLEROSIS	283
--	-----

Osmanov R.E., Fabrikantov O.L.

ASSOCIATION OF SYSTEMIC CELLULAR IMMUNITY WITH THE DEVELOPMENT OF CATARACT	295
---	-----

Agarkov N.M., Fabrikantov O.L., Lev I.V., Nikolashin S.I., Aksenov V.V.

FEATURES OF THE COMPLEMENT SYSTEM IN PRIMARY OPEN-ANGLE GLAUCOMA AND DRY EYE SYNDROME IN THE ELDERLY	301
---	-----

Fabrikantov O.L., Osmanov R.E.

SYSTEMIC INTERLEUKIN PROFILE OF ELDERLY PATIENTS WITH CATARACT COMBINED WITH SENILE ASTHENIA SYNDROME	309
--	-----

Kovyazina N.A., Alkhutova N.A., Kamaev A.V., Trusova O.V., Zhizhina O.L., Egorova M.O.

STUDYING INFORMATIVITY OF SPECIFIC IgE LEVELS TO WHOLE COW MILK ALLERGEN AND ITS COMPONENTS, AS WELL AS TO SOY AND GLUTEN IN CHILDREN	317
--	-----

Yarmolinskaya M.I., Durneva E.I., Markova K.L., Mikhailova V.A., Selkov S.A., Sokolov D.I.

MICROVESICLES DERIVED FROM LEUKOCYTES IN THE PERIPHERAL BLOOD OF PATIENTS WITH EXTERNAL GENITAL ENDOMETRIOSIS	327
--	-----

Semenova E.V., Pavliuk V.V., Uvarova M.A., Ivanov A.V.

FEATURES OF HUMORAL IMMUNITY AFTER COVID-19	337
--	-----

Dolgushina N.V., Menzhinskaya I.V., Beznoshchenko O.S., Mullabayeva S.M., Gorodnova E.A., Krechetova L.V.

PROFILE OF ANTIPHOSPHOLIPID ANTIBODIES AND COMPLEMENT SYSTEM IN COVID-19 PATIENTS OF DIFFERENT SEVERITY	351
--	-----

Sizyakina L.P., Andreeva I.I., Kharitonova M.V., Zaitseva N.S., Lyubimov D.S., Zakurskaya V.Ya., Totolian Areg A.

POST-VACCINATION IMMUNITY PHENOTYPES UPON USAGE OF EpiVacCorona VACCINE IN THE PERSONS WHO SUFFERED COVID-19	367
---	-----

Davydova E.V., Osikov M.V., Kaigorodtseva N.V.

IMMUNE CHANGES AT THE INJURED SITES IN OXAZOLONEINDUCED ULCEROUS COLITIS: INFLUENCE OF OZONE THERAPY	379
---	-----

Short communications

Kologrivova I.V., Suslova T.E., Koshelskaya O.A., Rebenkova M.S., Kharitonova O.A., Dymbrylova O.N., Andreev S.L.

MACROPHAGES IN EPICARDIAL ADIPOSE TISSUE AND SERUM NT-proBNP IN PATIENTS WITH STABLE CORONARY ARTERY DISEASE	389
---	-----

Berezhansky P.V., Tataurschikova N.S.

ENVIRONMENT-DEPENDENT MICROCIRCULATORY AND AUTONOMIC NEUROVASCULAR CHANGES IN THE CHILDREN WITH ALLERGIC RHINITIS	395
--	-----

Kibalina I.V., Tsybikov N.N., Fefelova E.V.

DYNAMICS OF THE CHEMOKINE ENA-78/CXCL5 LEVELS IN BLOOD SERUM AND SKIN EXUDATE IN PATIENTS WITH ATOPIC DERMATITIS	401
---	-----

Kurtasova L.M., Lubnina T.V., Safontseva E.V.

CHANGES IN FUNCTIONAL ACTIVITY OF PERIPHERAL BLOOD NEUTROPHILS IN YOUNG CHILDREN WITH RECURRENT RESPIRATORY INFECTION	407
--	-----

Androsova L.V., Simashkova N.V., Shushpanova O.V., Otman I.N., Zozulya S.A., Shushpanova T.V., Klyushnik T.P.

INNATE AND ACQUIRED IMMUNITY INDICES IN ASSESSING THE CLINICAL SEVERITY OF PATIENTS WITH CHILDHOOD SCHIZOPHRENIA	413
---	-----

Chronicle	419
------------------------	-----

Obituary	421
-----------------------	-----

Instructions to Authors	423
--------------------------------------	-----

Author index	426
---------------------------	-----

Subject index	426
----------------------------	-----

STREPTOCOCCUS PYOGENES: ФЕНОМЕН НЕИММУННОГО СВЯЗЫВАНИЯ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ ЧЕЛОВЕКА И ЕГО РОЛЬ В ПАТОЛОГИИ

Бурова Л.А., Суворов А.Н., Тотолян Артем А.

ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Резюме. М- и М-подобные белки являются основными факторами патогенности широко распространенного и потенциально смертельного бактериального патогена *Streptococcus pyogenes*. Эти белки обеспечивают устойчивость микроба к врожденным и адаптивным иммунным реакциям, привлекая специфические белки человека на поверхность стрептококка. Неиммунное связывание иммуноглобулинов G (IgG) и A (IgA) через их Fc-домены М- и М-подобными белками было описано более 40 лет назад, но его значение в патогенности *Streptococcus pyogenes* нельзя считать окончательно решенным. Обнаружение данного феномена следует отнести к весьма значительным достижениям современной микробиологии, поскольку он оказал огромное влияние на создание инновационных подходов, технологий и средств микробиологической, иммунологической и молекулярной диагностики. Он также повлиял на фундаментальные исследования в области патогенеза актуальных инфекционных заболеваний и их осложнений, вызываемых *S. pyogenes*. Предполагалось, что неиммунное связывание иммуноглобулинов хозяина имеет значение в основном при иммунных состояниях на поверхности слизистых оболочек и в секрете, но не в плазме, в то время как другие исследования свидетельствовали о важности данного феномена в защите микробов от фагоцитоза в неиммунной крови макроорганизма. Было также показано, что эффект Fc-связывания повышает патогенность стрептококков как в первичном очаге инфекции, так и при хронизации процесса, способствуя развитию аутоиммунных заболеваний, вызванных инфекцией *S. pyogenes*, приводя к повреждению тканей у экспериментальных животных. Экспериментальный аутоиммунный процесс можно предупредить, используя введение животным очищенных Fc-фрагментов иммуноглобулинов, блокируя процесс на ранних стадиях его развития.

Существенное место в патогенезе IgA — нефропатии (IgAN) принадлежит стрептококковым заболеваниям. IgAN описывают как мезангиально-пролиферативный процесс, обусловленный первоначальными отложениями IgA-Fc α белка в клетках почечного мезангиума. Литературные данные указывают на успешное моделирование отдельных признаков IgAN и расширяют наши представления о патогенных свойствах и функциях Fc α -рецепторных М-белков *S. pyogenes*. Рассмотренные в обзоре данные подчеркивают также актуальность выдвигаемых представлений о важной роли неиммунного связывания иммуноглобулинов в стрептококковой патологии, даже в случаях, различающихся по механизму развития. Эти исследования в том числе и возможный поиск средств и методов профилактической и потенциально терапевтической направленности требуют нового внимания к исследова-

Адрес для переписки:

Бурова Лариса Александровна
ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»
197376, Россия, Санкт-Петербург,
ул. Акад. Павлова, 12.
Тел.: 8 (812) 234-05-42.
E-mail: lburova@yandex.ru

Address for correspondence:

Burova Larisa A.
Institute of Experimental Medicine
197376, Russian Federation, St. Petersburg,
Akad. Pavlov str., 12.
Phone: 7 (812) 234-05-42.
E-mail: lburova@yandex.ru

Образец цитирования:

Л.А. Бурова, А.Н. Суворов, Артем А. Тотолян
«*Streptococcus pyogenes*: феномен неиммунного
связывания иммуноглобулинов человека и его роль
в патологии» // Медицинская иммунология, 2022. Т. 24,
№ 2. С. 217-234.
doi: 10.15789/1563-0625-SPP-2450
© Бурова Л.А. и соавт., 2022

For citation:

L.A. Burova, A.N. Suvorov, Artem A. Totolian “*Streptococcus
pyogenes*: phenomenon of nonimmune binding of human
immunoglobulins and its role in pathology”, *Medical
Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2022,
Vol. 24, no. 2, pp. 217-234.
doi: 10.15789/1563-0625-SPP-2450
DOI: 10.15789/1563-0625-SPP-2450

ниям связывания Fc-фрагментов иммуноглобулинов G (IgG) и A (IgA) M- и M-подобными белками *Streptococcus pyogenes*.

Ключевые слова: *Streptococcus pyogenes*, Fc-связывающая активность стрептококков, аутоиммунные осложнения, постстрептококковый гломерулонефрит, миокардит, IgA-нефронпатия

STREPTOCOCCUS PYOGENES: PHENOMENON OF NONIMMUNE BINDING OF HUMAN IMMUNOGLOBULINS AND ITS ROLE IN PATHOLOGY

Burova L.A., Suvorov A.N., Totolian Artem A.

Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. M and M-like proteins represent the main pathogenicity factors of *Streptococcus pyogenes*, a widely spread and potentially lethal bacterial pathogen. These proteins provide resistance of the microbe to innate and adaptive immune response, due to attraction of specific human proteins to the streptococcal surface. Non-immune binding of immunoglobulins G (IgG) and A (IgA) via their Fc domains to M and M-like proteins was described over 40 years ago, but its role for the pathogenicity of *Streptococcus pyogenes* is far from definite resolution. The discovery of this phenomenon should be considered among quite significant achievements of modern microbiology, since it had a huge impact upon development of innovative approaches, technologies and tools for microbiological, immunological and molecular diagnostics. It also promoted fundamental studies in pathogenesis of distinct infectious states and their complications caused by *S. pyogenes*. The non-immune binding of host immunoglobulins was previously suggested to be important mainly in immune conditions on the surface of mucous membranes and their secretions, but not in blood plasma, whereas other studies have pointed to significance of this phenomenon in protecting microbes from phagocytosis in non-immune blood of the host. It was also shown that the effect of Fc-binding causes increased pathogenicity of streptococci both in primary focus of infection, and during chronic course of the process, thus contributing to development of autoimmune diseases caused by *S. pyogenes* infection and leading to tissue damage in experimental animals. The experimental autoimmune process can be prevented by administering purified Fc fragments of immunoglobulins to the animals, blocking this process at the early stages of its development.

A significant place in pathogenesis of IgA nephropathy (IgAN) belongs to streptococcal diseases. IgAN has been described as a mesangial proliferative process, due to initial IgA-Fc α deposition in renal mesangium cells. The data from literature describe successful modeling of individual IgAN traits, and expand our understanding of pathogenic properties and functions of Fc α binding receptor M proteins of *S. pyogenes*. The data reviewed in the article also presume the relevance of recently proposed ideas about an important role of non-immune Ig binding in streptococcal diseases, even in cases that differ in their development mechanism. These studies, including possible search for tools and techniques of preventive and potentially therapeutic applications, require additional efforts to study the binding of Fc fragments of IgG and IgA to M and M-like proteins of *Streptococcus pyogenes*.

Keywords: *Streptococcus pyogenes*, streptococcal IgFc-binding proteins, post-streptococcal glomerulonephritis, myocarditis, IgA nephropathy

М-белки *Streptococcus pyogenes*

Streptococcus pyogenes (стрептококки группы А, СГА) — распространенная группа грамположительных патогенов, вызывающих многие заболевания человека. Они являются возбудителями скарлатины, ангины, фарингита, синуситов и отита; вызывают пиодермию, импетиго и рожистое воспаление; в силу инвазивности могут стать причиной некротизирующего фасциита и миози-

та, септицемии и синдрома токсического шока, высоко летальных из-за быстрого развития процесса и системного поражения органов. Кроме того, такие аутоиммунные состояния, как постстрептококковые ревматическая лихорадка и гломерулонефрит, являются следствием перенесенной СГА-инфекции. Эти заболевания остаются серьезной угрозой здоровью в развивающихся странах [32, 33, 101, 120]. В патогенезе каждого

из этих заболеваний ведущую роль играют белки семейства М-протеинов, локализованные на поверхности бактерий [45, 49]. М-белок образует плотный фибриллярный слой, который выступает примерно на 500 Å над клеточной стенкой бактериальной клетки [114]. Фибриллы М-белка имеют димерную α -спиралевидную структуру, которая захватывает большую часть длины этого белка, состоящего из 330-440 аминокислотных остатков [35, 82, 83, 95]. Расположение М-белков на поверхности бактерий делает их основной мишенью иммунной системы макроорганизма.

Если ранее существовало представление о СГА, как носителях одного М-белка со специфической функцией типового антигена, то сегодня речь идет, как минимум, о трех белках М-семейства: Emm, Mgr и Enn [85]. Emm-белок встречается во всех штаммах СГА, между тем как два других белка, отнесенных к М-подобным белкам, присутствуют у 85% всех изолятов СГА. Все белки кодируются генами Mga-регулона [54, 57]. Белок Emm принят в качестве стандарта *emm*-генотипирования СГА [47]. В настоящее время известно около 200 *emm*-генотипов СГА [47, 82].

Одной из основных функций М-белка является обеспечение устойчивости микроба к элиминации средствами врожденного и адаптивного иммунитета. Формирование устойчивости определяется взаимодействием ряда белков плазмы человека с поверхностью клеток СГА, что препятствует опсонизации бактерий белком комплемента C3b и специфическими антителами. Это позволяет СГА избежать поглощения и последующего переваривания фагоцитами. Речь идет о пяти плазменных белках, механизм действия и структурное взаимодействие которых с М-белками либо хорошо изучены, либо исследуются и в настоящее время. Это фибриноген (Fg, мол. вес 340 kDa) [34, 63, 64, 76, 99, 122] и C4b-связывающий белок (C4BP, мол. вес 570 kDa) [16, 21, 117]. Фибриноген — белок системы свертывания крови, который используется СГА в качестве стерического щита, блокирующего связывание компонентов комплемента [104]. Третий, менее изученный белок, но его роль в патогенности СГА была показана на трансгенных мышах — это фактор Н (FN, мол. вес 150 kDa) [9, 46, 90]. C4BP и FN являются регуляторами активации комплемента и взаимодействуют с другими белками комплемента для снижения уровня C3b с целью защиты собственных тканей хозяина от повреждения комплементом. C4BP и FN также стерически конкурируют с опсонизирующими антителами против эпитопов М-белка [104]. Четвертым белком, рекрутируемым М-протеином в очаг инфекции, также является компонент системы свертывания крови — пламиноген

(Pla), который связывается непосредственно с М-подобным белком бактерий [15, 100, 110, 123] или опосредованно через фибриноген. Пламиноген трансформируется в ферментативно активный пламин под действием стрептокиназы А. Было показано, что пламин способен вызывать протеолиз C3b-компонента комплемента, приводя к снижению уровня опсонизации бактерий и их фагоцитарного поглощения нейтрофилами [75]. Локализованный на бактериях пламин способствует переходу локальной стрептококковой инфекции в инвазивную [39, 110].

Более 40 лет назад была обнаружена еще одна, пятая форма, взаимодействия М-белка с белками плазмы — неиммунное взаимодействие М-белка с иммуноглобулинами G (IgG) и A (IgA) за счет их Fc-фрагментов [19, 62, 66, 71, 72]. Было показано, что ряд типов стрептококковых М-белков связывают человеческие IgG, IgA или оба. IgG в основном содержится в плазме, но также может быть обнаружен в лимфе и в незначительном количестве на слизистых поверхностях, в то время как IgA является основным классом антител на слизистых оболочках [59]. Связывание иммуноглобулинов М- и М-подобными белками стрептококков является температурно и аллостерически зависимым процессом [36].

Fc-связывание иммуноглобулинов *Streptococcus pyogenes*

Способность микробов связывать Fc-фрагмент молекулы IgG человека и ряда млекопитающих была первоначально описана у *Staphylococcus aureus* — рецептором служил протеин А [52]. Авторы исходно допускали, что протеин А и IgG взаимодействуют подобно антигену и антителу, и только в 1966 году Forsgren и Sjoquis [48] установили, что протеин А реагирует с Fc-фрагментом IgG человека. Этот феномен авторы назвали псевдо-иммунной реакцией. Позднее подобное связывание Fc-фрагмента IgG человека было обнаружено и у стрептококков. Kronvall показал, что миеломный IgG человека всех четырех подклассов связывается поверхностными структурами стрептококков серогрупп А, С и G [66], причем это связывание было аналогично взаимодействию стафилококкового протеина А с Fc-фрагментом молекулы IgG человека, хотя и отличалось от последнего по спектру связывания подклассов IgG человека и по связыванию IgG различных видов млекопитающих. Это позволило выделить дополнительно к I типу бактериальных Fc-рецепторов (протеин А) еще четыре типа стрептококковых IgGFc-рецепторов. IgGFc-рецепторы, характерные для штаммов СГА, были обозначены как тип II. Fc-рецепторы этого типа взаимодействуют с IgG 1, 2, 3 и 4 человека и с поликлональными IgG кролика и свиньи [87, 88].

Christensen, Schalen и соавт. выявили способность некоторых штаммов СГА связывать не только мономерный IgG, но и агрегированный IgG человека, как в присутствии нормальной сыворотки, так и без нее. Эта активность характерна преимущественно для «нефритогенных» штаммов типов M12 и M49, выделенных от больных с постстрептококковым гломерулонефритом [37, 105]. Помимо выше перечисленных типов Fc-рецепторов, у СГА выявлена способность связывать иммунные комплексы [4, 22]. Тип III Fc-рецепторов (протеин G) типичен для штаммов серогрупп C и G, выделяемых от человека. Fc-рецепторы типа IV характерны для стрептококков группы G, вызывающих инфекцию у крупного рогатого скота, а Fc-рецепторы типа V выявлены у *Streptococcus zooepidemicus* [87, 88].

Открытие данного феномена следует отнести к значительным достижениям современной микробиологии, поскольку он оказал огромное влияние на создание инновационных подходов и технологий для микробиологической, иммунологической и молекулярной диагностики. Он также повлиял на фундаментальные исследования в области патогенеза актуальных инфекционных заболеваний и их осложнений, вызываемых *S. pyogenes* [7, 25, 27, 70, 85].

Уникальность феномена состоит и в том, что СГА большинства M-типов взаимодействуют в основном с IgG человека и кролика. Это позволяет изучать роль неиммунного связывания IgG в патологии именно на кроликах. Возможно, что Fc-связывающая активность СГА определяется способностью бактерий именно этой серогруппы вызывать заболевания преимущественно у человека, способностью, выработанной СГА в процессе его длительной эволюции в условиях паразитирования в организме человека.

Ранее считалось, что типоспецифические M-белки и IgGFc-связывающие белки СГА являются отдельными группами молекул. В настоящее время показано, что IgGFc-связывающие белки СГА имеют высокую степень гомологии с M-белками, и их синтез регулируется общими генами Mga-регулона [54, 56, 57, 109, 121]. Поэтому их следует отнести к семейству M- или M-подобных белков. Сайты связывания с IgG локализованы в области между СН2- и СН3-доменами тяжелой цепи иммуноглобулина G с вовлечением в это связывание трех аминокислотных остатков гистидина в положениях 435, 433, 310 и тирозина в положении 436 [85, 108].

У *S. pyogenes* также выявлена способность связывать Fc-фрагмент молекулы IgA. Первоначально неиммунное связывание IgA было показано у штаммов типов M4, M11 и M57 [38], реагирующих с миеломным IgA человека. Позднее эта

активность была обнаружена и у штаммов СГА типов M49 и M60 [67]. Указанные M-типы связывают оба подкласса: IgA1 и IgA2 человека [70, 85].

Способность стрептококковых M-белков неиммунно связывать IgG, иммунные комплексы и IgA определяется наличием у них Fcγ и Fcα рецепторов, различающихся по аминокислотной последовательности. Описаны три IgG- и один IgA-рецептор [85]. Стрептококковые белки семейства M-протеинов Emm, Mfp и Epp связывают как IgG, так и IgA, в то время как M-подобный белок Arp активен только в отношении IgA человека [70, 85].

Биологическое значение взаимодействия M- и M-подобных белков СГА с иммуноглобулинами в инфицированном организме многопланово. Молекулы Fc-связанного иммуноглобулина блокируют опсонизацию бактерий. Помимо этого, «частокол» из Fc-связанного иммуноглобулина на поверхности бактерий участвует в их защите от фагоцитарного поглощения. Связывание микробными клетками плазменных белков может быть чревато их дисбалансом в макроорганизме. Показано также, что стрептококковые IgGFc-связывающие штаммы способны при введении кроликам индуцировать синтез анти-IgG-класса G [5, 12, 31, 53, 68], в итоге приводящий к высокой концентрации в крови циркулирующих IgG-содержащих иммунных комплексов. Все последствия этих событий и их роль в стрептококковой патологии еще далеки от полного изучения.

Аутоиммунные заболевания стрептококковой этиологии

По патогенезу постстрептококковых поражений сердца и почек в научной литературе накоплен значительный материал. Это процессы, при которых происходит переход инфекционного заболевания в иммунопатологическое состояние. При повреждении тканей в органах всегда должен существовать фактор, инициирующий этот переход. Он присутствует в каскаде взаимосвязанных реакций между патогеном и хозяином, и понимание всей совокупности и последовательности патогенетических событий оценивается по мере выявления природы инициирующего фактора или факторов, запускающих патологический процесс.

Механизм аутоиммунных осложнений, как следствия перенесенной СГА-инфекции, и сегодня является предметом научных дискуссий. Примером служат постинфекционный гломерулонефрит (PSGN) и ревмокардит (RHD).

Неиммунное связывание IgG, по-видимому, участвует в патогенезе этих заболеваний. Долгое время PSGN рассматривали как осложнение инфекций, вызванных *S. pyogenes* штаммами M-типов 49, 55, 57 и 60 (возбудители кожных ин-

фекций) и М-типов 1, 2, 4, и 12 (возбудители инфекции верхних дыхательных путей) [101, 102]. Однако сегодня признано, что стрептококки группы А не обладают «монополией» на «нефритогенность». Исследования отдельных случаев и эпидемических вспышек показали, что гломерулонефрит может развиваться и после инфекций, вызываемых *Streptococcus zooepidemicus* [11, 13], *Streptococcus pneumoniae* [96, 116], *Streptococcus constellatus* [10] и *Streptococcus anginosus* [77].

Идентификация стрептококкового антигена или антигенов, обладающих нефритогенной активностью, продолжает оставаться предметом споров и обсуждений до настоящего времени. Накопленные экспериментальные и клинические данные указывают на возможную связь развития патологического процесса в почечной ткани при PSGN со следующими продуктами СГА: стрептокиназой (СКА) [91, 92], вызывающей трансформацию плазминогена в фермент плазмин; глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназой — плазминовым рецептором, ассоциированным с нефритом, NAPIg [126]; цистеиновой протеиназой, известной как экзотоксин В (SPEB) [43, 58, 74]. Эти данные связаны с выявлением в биоптатах пораженных почек и в крови реконвалесцентов PSGN указанных антигенов и антител к ним. Эти антигены индуцируют продукцию моноцитарного хемоаттрактантного белка 1 (МХБ-1) в мезангиальных клетках и синтез провоспалительных цитокинов: IL-6, TNF α , IL-8 и TGF- β [101, 103].

Приведенные доказательства нефритогенности этих трех антигенов не безупречны. Так, например, у *Streptococcus zooepidemicus*, штамма MGCS10565, вызвавшего крупную эпидемию гломерулонефрита в Бразилии [11], в геноме отсутствовал ген экзотоксина В, что исключает иницирующую роль данного продукта в развитии PSGN. По мнению авторов исследования, сравнительный анализ генома микроорганизма указывает на необходимость критической оценки молекулярных механизмов, патогенеза PSGN [11]. Поэтому если экзотоксин В и играет роль в развитии PSGN, то явно неиницирующую, во-первых, а, во-вторых, не может быть его причиной во всех случаях.

Не очевидна и роль стрептокиназы в индукции экспериментального гломерулонефрита, поскольку опыты этим продуктом СГА ставили на мышах [91, 92, 93], хотя известно, что СКА не трансформирует мышинный плазминоген в плазмин, момент, по-видимому, важный для развития постинфекционного гломерулонефрита [1, 6]. По этой причине моделирование гломерулонефрита на мышах должно быть малоэффективно. А обнаружение СКА на базальной мембране почечных

клубочков мышей могло отражать лишь накопление в них иммунных комплексов, содержащих данный продукт.

Наиболее значимо участие в генезе PSGN комплекса плазмينا с NAPIg [6, 101]. Плазмин является сериновой протеазой широкого спектра и способен разрушать мезангиальную ткань в почках. Следует отметить, что плазмин постоянно образуется в здоровом организме под действием урокиназы, но он не повреждает почечную ткань, а NAPIg присутствует у большинства людей. Все эти данные указывают на существование нескольких антигенов с нефритогенной потенцией или еще не идентифицированного «виновника» PSGN. Не каждый антиген или антитело, обнаруживаемые в почечных гломерулах, могут стать причиной патологии в данном органе и тем более в его инициации [6]. Можно предположить, что помимо перечисленных выше факторов нефритогенности, должен существовать и другой фактор, оптимизирующий их действие, и, тем самым, иницирующий поражение.

McIntosh и соавт. [79, 80, 81] первыми поставили вопрос о роли взаимодействия СГА с иммуноглобулинами человека в генезе PSGN. Были выдвинуты представления о возможной роли анти-IgG-антител в этой патологии. Они показали, что нейраминидаза *S. pyogenes* вызывает десикализацию IgG и аутологичных анти-IgG-антител, и обнаружили их депозицию в почечной ткани кроликов, инфицированных СГА. Анализ показал, что анти-IgG- и анти-IgM-аутоантитела имелись у большинства пациентов с PSGN в первую неделю заболевания. В связи с этим следует понять условия, при которых собственные IgG человека (или подопытного животного) могут приобрести свойство аутоантигена.

Патогенные стрептококки, М- и М-подобные белки которых неиммунно связывают IgG, активно колонизирующие слизистую верхних дыхательных путей, формируют инфекционные очаги с привлечением большого числа молекул IgG. Очаг инфекции, содержащий при высеве 10^8 КФЕ СГА, будет нести значительное количество связанных с бактериями молекул IgG, поскольку каждая КФЕ способна связать до 800 молекул IgG [6].

Это обстоятельство позволило нам допустить следующий предположительный сценарий развития PSGN. Связанный IgG подвергается «атаке» энзимами СГА — IgG-деградирующим ферментом (IdeS), эндогликозидазой (EndoS) и экзотоксином В (SPEB), расщепляющими γ -цепь нативного IgG в шарнирной области молекулы [125]. Данная область отличается от сайта расщепления папаином [40, 41]. При этом образуются фрагменты IgG, которые в совокупности,

помимо существующего очага бактериальных антигенов, создадут выраженный очаг аутоантигенного стимула, вызывающий синтез антител к этим фрагментам, а по существу аутоантител к IgG. Наличие таковых приведет к формированию в высокой концентрации аутоиммунных комплексов по типу IgG — анти-IgG. Макроорганизм постоянно должен освобождаться от них путем связывания иммунных комплексов с тканевыми Fc-рецепторами базальной мембраны почек. Депозиция комплексов активирует комплемент и мобилизует лейкоциты и фагоциты. В итоге, с участием провоспалительных цитокинов, в ткани почек развиваются очаги иммунного воспаления, в которых могут создаваться условия для деструктивного действия мембрано-атакующего комплекса комплемента C5b-C9, а в последствии экзотоксина В или плазмينا.

Положения данной гипотезы относительно инициации PSGN построены на основе обобщенных данных экспериментов на кроликах [4, 6, 7, 8, 22, 28, 30].

Было показано, что в результате связывания стрептококками IgG у кроликов синтезируются антитела, специфичные в отношении IgG кролика и IgG человека. В крови подопытных животных обнаруживали анти-IgG-антитела в титрах 1:80-1:640, в зависимости от срока забора проб и индивидуальных особенностей кроликов. В гломерулах наблюдали отложения IgG и C3-компонента комплемента. Их депозиция сопровождалась продукцией провоспалительных цитокинов (IL-1 β , TNF α , IL-6) и инфильтрацией тканей лимфоцитами/макрофагами, что в итоге приводило к формированию локального иммунного воспаления с последующей дегенерацией и деструкцией ткани. Процесс завершался развитием мембранозно-пролиферативного гломерулонефрита с некоторой вариабельностью в динамике морфологических проявлений у отдельных кроликов. Эксперименты на кроликах подтвердили высокую вероятность развития PSGN по изложенной схеме [6, 8, 27, 28, 29, 30, 31]. Они показали, что за иммунным воспалением, формируются изменения, подобные тем, что происходят при мембранозно-пролиферативном и фибропластическом гломерулонефрите у человека [28].

Гломерулонефрит у кроликов удавалось моделировать при внутривенном введении им убитых культур СГА типов M1, M15, M22, сохранивших Fc-связывающую способность в отношении нативного IgG, а также введением культуры типа M12, связывающей иммунные комплексы (рис. 1). Штаммы, отрицательные по связыванию Fc-фрагмента IgG, либо мутанты по данному признаку, не вызывали образования анти-

IgG-антител и не обладали «нефритогенностью». Интересно, что штамм типа M22, несущий два М-белка (Emm и Mrp), и его мутантные клоны, сохранившие любой из двух М-белков, обладали нефритогенностью, в отличие от двойного мутанта, полностью лишенных Fc γ -рецепторов. Введение кроликам очищенных М-белков СГА типа M22 вызывало экспериментальный гломерулонефрит у кроликов [27] в отличие от коммерческих Fc-рецепторных препаратов: А- и G-протеинов.

Внимания заслуживает опыт, в котором гломерулонефрит у кроликов был вызван введением рекомбинантного Fc γ -рецепторного М-белка генотипа *emm12*, наиболее часто выделяемого от больных с PSGN, и наиболее стабильного по связыванию иммунных комплексов, по продукции анти-IgG-антител и морфологическим признакам поражения почечных гломерул [4, 6, 22]. Иммуноморфологическая картина при использовании рекомбинантного Fc γ -рецепторного препарата была типична для экспериментального гломерулонефрита, а именно: в корковом слое выявляли патологически измененные клубочки; полости их капсул были расширены; в капиллярных петлях наблюдали некроз и атрофию. Деструктивные изменения отмечались и в проксимальных канальцах: стенки части канальцев утолщены и отечны, эпителиальные клетки, выстилающие просвет канальцев, были с признаками некроза, в просветах обнаруживались белковые массы. Вокруг поврежденных канальцев выявлялись поля соединительной ткани с разрастанием волокнистой интерстициальной ткани стромы. В воспалительных клеточных инфильтратах обнаруживали малые и средние лимфоциты, незрелые и зрелые плазматические клетки, являющиеся активными продуцентами иммуноглобулина. В почечных клубочках были выявлены отложения IgG и C3-компонента комплемента; титры анти-IgG-антител в крови кроликов колебались в пределах 1:80-1:640 [6].

Таким образом, нам удалось моделировать патологический процесс, сходный с мембранозно-пролиферативным и фибропластическим гломерулонефритом у человека, как IgGFc-позитивными штаммами СГА и выделенными из них М-белками, так и рекомбинантным Fc γ -связывающим белком. Это служит веским аргументом в пользу представлений об иницирующей роли данных белков и сопряженных иммунологических сдвигов, в патогенезе PSGN. Пока мы не располагаем доказательствами, позволяющими однозначно объяснить антигенную трансформацию связанного IgG в результате взаимодействия со стрептококковыми Fc γ -связывающими белками. Единственным до-

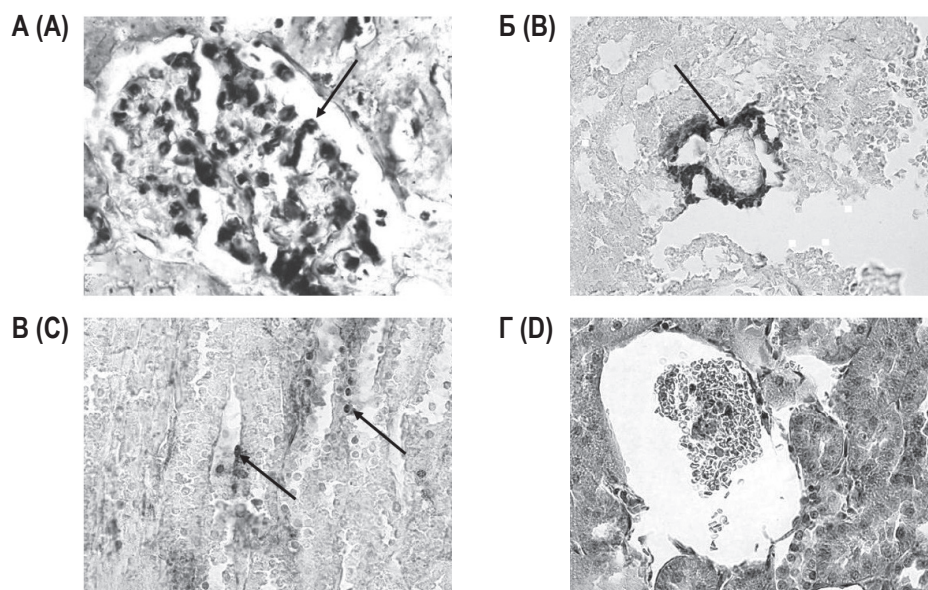


Рисунок 1. Иммуноморфологические изменения в корковом и мозговом слоях почки кролика, индуцированные *S. pyogenes* штаммом *emm12* [4]

Примечание. А – экспрессия $\text{TNF}\alpha$ мезангиальными клетками (стрелки) клубочка; Б – серповидное отложение IgG в стенке проксимального канальца (стрелка); В – депозиция С3-компонента комплемента в клетках дистальных канальцев (стрелки); Г – атрофия ткани почечного клубочка, обилие эритроцитов в его полости; А-В: иммуногистохимическая окраска, $\times 750$; Г – окраска гематоксилин-эозином, $\times 550$.

Figure 1. Immunomorphological changes in cortical and medullary layers of the rabbit kidney, induced by *S. pyogenes* strain *emm12* [4]

Note. A, the expression of $\text{TNF}\alpha$ by glomeruli mesangial cells (arrows); B, crescent IgG deposition in the wall of the proximal tubule (arrow); C, deposition of C3 component of complement in the cells of the distal tubules (arrows); D, atrophy of the tissues of the renal glomeruli, the abundance of red blood cells in the cavity; A-C: immunohistochemical staining, $\times 750$; D, staining with hematoxylin-eosin, $\times 550$.

пущением этому является возможное конформационное преобразование связавшихся со стрептококками молекул IgG.

Дополнительно было показано, что введение нативного IgG человека или кролика, очищенных Fc-, но не Fab-фрагментов, экспериментальным животным на ранних сроках развития патологического процесса, способно предупредить или ослабить развитие гломерулонефрита [2, 23, 24], инициированного СГА типа М1. Теоретически допустимыми являются два пути подавления процесса в почечной ткани, а именно:

а) Fc-фрагменты IgG блокируют IgGFc-связывающую активность вводимых бактерий и, тем самым, ингибируют образование аутоантигенов и продукцию анти-IgG-аутоантител;

б) либо Fc-фрагменты IgG блокируют тканевые Fcγ-рецепторы, препятствуя развитию иммунного воспаления и экспрессии медиаторов воспаления.

О способности иммуноглобулина G подавлять развитие экспериментального гломерулонефрита у крыс первыми сообщили испанские исследователи [50]. Данная работа имела несомненную практическую направленность. В этом

плане приведенные выше эксперименты важны в связи с возможностью использования препаратов иммуноглобулина G и его Fc-фрагмента с целью профилактики PSGN при СГА-инфекции, а также служат еще одним доказательством роли Fcγ-связывающих М-белков в патогенезе PSGN. Дополнительно необходимо изучить механизм данного эффекта Fc-фрагментов IgG и ответить на вопрос: могут ли они конкурировать с бактериальными и тканевыми Fcγ-рецепторами.

Патогенез ревматической лихорадки и ревмокардита (ARF/RHD) нельзя считать до конца изученным. Сходство между антигенами *S. pyogenes* и белками хозяина рассматривается рядом авторов как фактор, запускающий аутоиммунный процесс при стрептококковой инфекции [44, 98]. Исследования показали, что молекулярная мимикрия стрептококковых антигенов позволяет генерировать антитела, которые перекрестно реагируют с антигенами СГА и с белками ткани хозяина, включая сердечный миозин, коллагены I и IV, тропомиозин, ламинин, виментин и кератин [44]. Возможность существования и участия перекрестно-реагирующих антигенов (ПР-антигены) в данной патологии с теорети-

ческих позиций не должна вызывать сомнений, поскольку эволюция могла отобрать и сохранить в белках млекопитающих гомологичные аминокислотные последовательности белков бактерий. Закономерен вопрос: может ли «мимикрия» стать исходной причиной поражения конкретного органа? Если бы ПР-антигены могли самостоятельно, без внешнего участия, инициировать повреждение ткани, то антимикробными иммунными сыворотками и иммунными сыворотками к соответствующим антигенам микроба можно было бы моделировать патологию в органах экспериментального животного. Однако такая возможность на сегодня вряд ли может считаться доказанной [6].

Ревматическая лихорадка и ревмокардит — это осложнения стрептококковой инфекции, которые являются исключительно болезнями человека, поэтому определение патогенетически значимых звеньев этой патологии, требует решения сложной задачи по подбору «надежной» модели на животных [25, 26, 51, 69, 98]. Животные модели, включающие крупный рогатый скот, овец, свиней, собак, кошек, морских свинок, крыс и мышей, не раз использовали для воспроизведения аутоиммунных и воспалительных реакций по типу ARF/RHD. Ряд моделей на грызунах внесли значительный вклад в лучшее понимание фундаментальных механизмов миокардита и вальвулита, которые развивались при воздействии биологически активных продуктов СГА. Так, при использовании крыс линии Lewis [60, 69, 98], которым вводили стрептококковые антигены, было обнаружено развитие миокардита и вальвулита с инфильтрацией ткани мононуклеарными лейкоцитами — картина аналогичная той, которая встречается при ARF/RHD у человека. При этом наблюдалась продукция антител, которые перекрестно реагировали с белками сердечной ткани. Авторы рассматривают данную модель как надежную для изучения механизмов, приводящих к патологии миокарда и сердечных клапанов, но подчеркивают, что «сравнение экспериментальных результатов с клиническими наблюдениями для экстраполяции последовательности событий, которое следует за заражением стрептококками, приводящим к аутоиммунным осложнениям, требует особой осторожности» [98].

В наших экспериментах по моделированию стрептококкового миокардита были использованы кролики. Мы исходили из того, что IgGFc-связывающие рецепторы М- и М-подобные белки СГА не делают существенных различий в связывании IgG человека и кролика [85]. У всех кроликов, которым, как и при моделировании PSGN, вводили инактивированную вирулентную культуру СГА типа М1, обнаруживали депозицию

IgG и С3-компонента комплемента в сарколемме, в межмиофибриллярных пространствах, а также в отечной интерстициальной ткани и на базальной мембране капилляров. У этих же кроликов была выявлена положительная окраска активированных моноцитов/макрофагов на IL-6, IL-1 β и TNF α . Изменения в миокарде кроликов характеризовались выраженными деструктивно-дегенеративными изменениями в саркоплазме и миофибриллах. В частности, в саркоплазме с большим количеством гипертрофированных митохондрий отмечался частичный или полный распад крист, деструкция матрикса вплоть до полного его просветления, уменьшение количества гликогена. Повреждение и разрушение митохондрий и отек саркоплазмы наблюдали в краевых зонах мышечных волокон, прилежащих к базальной мембране капилляров. В этой же зоне проявлялись признаки разрушения миофибрилл (рис. 2). Помимо перечисленных изменений, отмечали выраженную воспалительную реакцию. Так, в капиллярах миокарда наблюдали выселение из кровотока моноцитов, их адгезию и выход в зону серозно-фибринозного отека периваскулярного пространства. По-видимому, за счет усиленной продукции провоспалительных цитокинов активированными моноцитами/макрофагами, происходило повреждение митохондрий (набухание, исчезновение крист, деструкция), которыми особенно богата сердечная мышца. Отмечали также распад миофибрилл за счет разрушения митохондрий, во множестве расположенных между миофибриллами, и разрушение саркоплазматического ретикулума. Картину иммуноморфологических изменений в миокарде кроликов, инъецированных IgG Fc-позитивным СГА, можно оценить, как миокардит, сопоставимый по характеру деструктивных изменений с ревматическим миокардитом у больных. Напротив, повреждение миокарда отсутствовало при введении штамма СГА, отрицательного по Fc-связыванию IgG [25, 26].

Для доказательства роли стрептококковых IgGFc-связывающих М- и М-подобных белков в индукции экспериментального миокардита были использованы изогенные мутанты СГА типа М22, дефектные по двум или одному из *fer*-генов, ответственных за экспрессию Mgr или Emm белков, соответственно. У кроликов, которым вводили исходный штамм типа М22 или его изогенные мутанты по одному из М-белков, была выявлена депозиция IgG и С3-комплемента в структурных элементах сердечной мышцы, продукция провоспалительных цитокинов IL-1 β , IL-6, TNF α и описанные выше деструктивно-дегенеративные изменения миокарда. Напротив, ни у одного из кроликов, получивших инъекции двойного му-

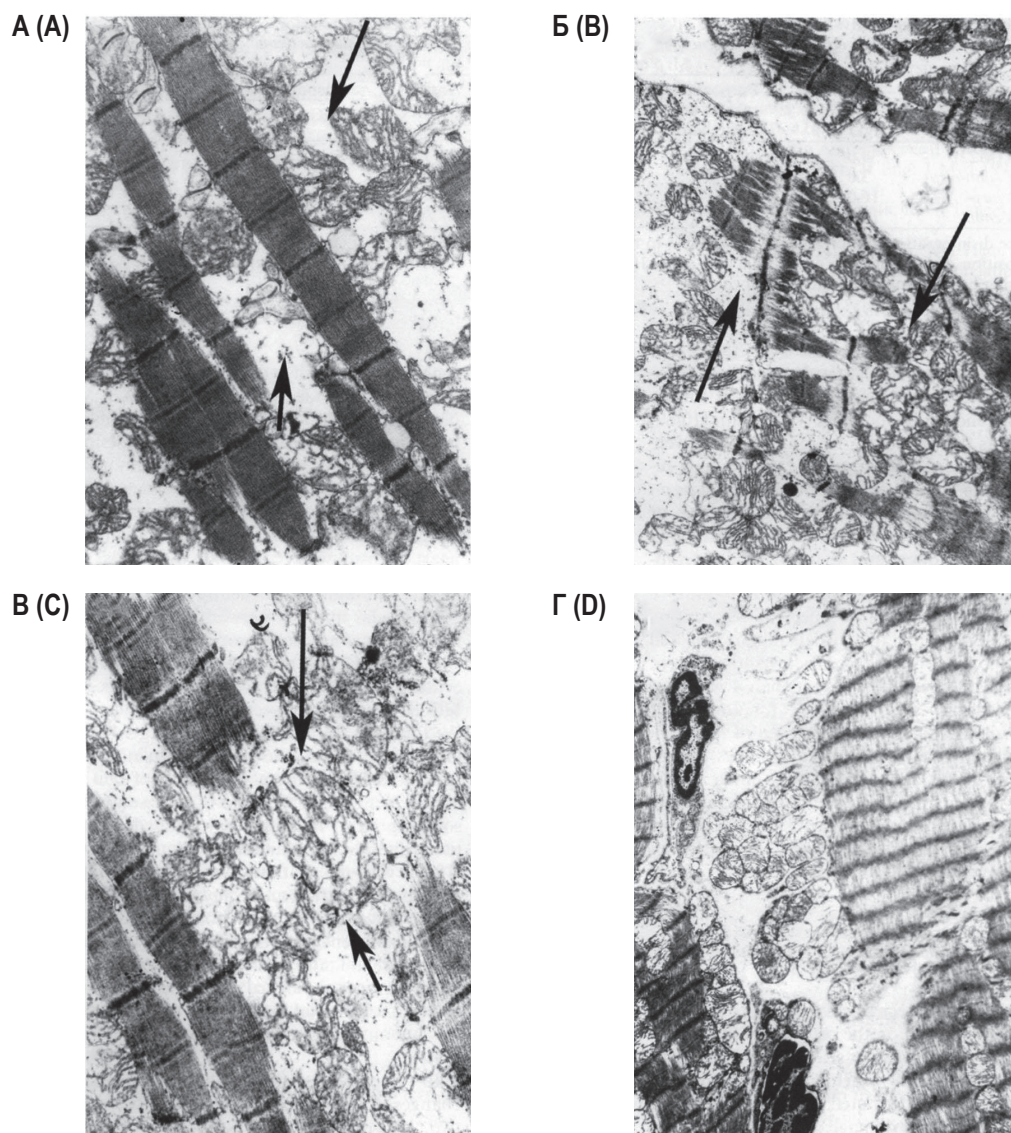


Рисунок 2. Морфологические изменения (показаны стрелками) в миокарде кролика после инъекций *S. pyogenes* типа М1, связывающего Fc-фрагмент IgG человека и кролика [25]

Примечание. А, Б, В – разрушение митохондрий и миофибрилл (TEM×16000, 16000 и 24000 соответственно); Г – морфология миокарда (норма) кролика, получившего инъекции контрольного IgG Fc-негативный штамма (TEM×16000).

Figure 2. Morphological changes (arrows) in the myocardium of the rabbit after injection of *S. pyogenes* type M1, binding the Fc fragment of human or rabbit IgG [25]

Note. A, B, C, the destruction of mitochondria and myofibrils (TEM×16000, 16000 and 24000, respectively); D, the morphology of the normal rabbit myocardium, which received injection of control IgG Fc-negative strain (TEM×16000).

танта М22, лишённого обоих М-белков, не было обнаружено депозитов или деструктивных изменений в миокарде, характерных для миокардита [25].

Данными экспериментами была подтверждена роль стрептококковых IgGFc-связывающих М- и М-подобных белков в инициации миокардита у кроликов. Именно эти же белки были ответственны за развитие экспериментального гломерулонефрита в опытах, описанных выше. Хотя миокардит и гломерулонефрит относятся к различным осложнениям СГА-инфекции, вызы-

ваемой разными М-типами, однако, полученные результаты свидетельствуют о том, что в их генезе есть общее звено, реализуемое посредством способности неиммунного связывания индуцировать аутоиммунный ответ организма, иммунное воспаление и повреждение тканей органа.

IgA-нефропатия

В современной нефрологии одно из ведущих мест занимают работы по изучению IgA-нефропатий (IgAN) — первичного гломерулонефрита, часто заканчивающегося хронической почечной недостаточностью, при которой 30-50%

пациентов нуждаются в заместительной терапии: диализе или трансплантации [78, 86, 124]. Диагностическим критерием данного заболевания служит депозиция иммуноглобулина А подкласса IgA1 в мезангиальных клетках почечных гломерул [20, 112, 124]. Авторы считают, что патогенез IgAN связан с синтезом и накоплением в крови больных молекулярных форм IgA1, недостаточных по галактозилрованию и сиализированию шарнирной области молекул IgA1 [124]. Они образуют димерные или полимерные комплексы IgA1, а также IgA1-содержащие иммунные комплексы с антигликановыми IgG-антителами против данного участка «патогенного» IgA1 [113, 119]. Их депозиция в мезангиуме, по сути, выполняет функцию триггера в развитии воспаления и IgAN [113]. IgA-содержащие комплексы в клубочках, вызывают мезангиально-пролиферативный процесс, склонный к хроническому течению с периодами ремиссий [20], возникающих, например, при диетическом питании, не содержащим глютен [42]. IgA-нефропатия может развиваться либо как первичное заболевание [115, 119], либо как следствие регуляторных нарушений в иммунной системе слизистых оболочек [97]. В этиологии IgAN значительное внимание отводится вирусным и бактериальным инфекциям. Существенное место в патогенезе IgAN принадлежит и СГА-инфекциям [84, 89]. Каждая из этих причин накладывает свой отпечаток на генез IgAN. Так, например, галактозо-дефицитные формы IgA1, на фоне инфекции, вызванной IgAFc-связывающими штаммами типов М4 и М60 *S. pyogenes*, активнее других форм IgA1 взаимодействуют с IgAFc-рецепторами М-подобного белка Agr, формируя при этом комплексы IgA1-IgAFc α , которые откладываются в гломерулах и ведут к мезангиально-пролиферативной IgAN [106, 107]. В качестве IgAFc-рецептора могут выступать либо Emm-белки большинства *emm*-генотипов СГА, связывающие как IgA [108], так и IgG, либо Agr-белки СГА *emm*-генотипов 4 и 60. Штаммы СГА этих типов связывают в основном IgA и крайне слабо — IgG. Согласно этому, в патогенезе IgAN участвуют различные IgA-содержащие комплексы, а именно, указанные выше комплексы «патогенных» IgA1-димеров и полимеров с IgG-антигликановыми антителами, либо комплексы IgA с Fc α -белком СГА. Однако, удельный вклад каждого из них в инициации IgAN нуждается в уточнении, поскольку очевидно, что IgA1 в полимерной форме либо в комплексе с IgG-антителами, сам может вызывать поражение гломерул, в том числе и на фоне стрептококковой инфекции.

Эксперименты по моделированию IgAN с использованием штамма типа М60, связывающе-

го главным образом Fc-фрагмент IgA человека, указывают на его высокую IgA-нефритогенную активность [3]. У подопытных животных имела место воспалительная реакция, которая проявлялась в выраженной лимфоцитарной инфильтрации тканей в зонах поражения структур нефронов; обнаруживалась депозиция IgA и C3-компонента комплемента в мезангиуме гломерул (рис. 3) и продукция провоспалительного цитокина TNF α . Именно в этих случаях наблюдалась воспалительная инфильтрация тканей [3]. Показатели поражения значительно варьировали в зависимости, по-видимому, от индивидуальной чувствительности кроликов. Разброс подобных показателей наблюдали и японские авторы при моделировании IgAN на мышах [55]. Ни у одного кролика не удалось выявить депозицию IgG, притом, что имела место выраженная депозиция IgA. По-видимому, она была результатом отложения комплексов IgA с Fc α -рецепторным белком СГА типа М60. Данное допущение вполне может служить подтверждением вывода шведских авторов, обнаруживших в биоптатах от пациентов с IgA-нефропатией Fc α -белок Agr [107]. Поскольку депозиция IgA-содержащих комплексов в мезангиальных клетках гломерул считается достоверным критерием диагностики IgAN, вызванной СГА [106], нам, по-видимому, удалось создать «кроличью» модель IgAN посредством IgAFc-связывающего штамма СГА.

Согласно современным представлениям, для первичной формы IgAN типичны депозиты, содержащие IgA в сочетании с анти-IgA-антителами класса IgG [119], между тем как для «стрептококковой» IgAN характерно образование комплексов на основе IgAFc-рецепторных белков СГА [107], хотя в обоих случаях IgA представлен дефицитным по галактозе IgA1. Этими различиями могут определяться механизмы отложения комплексов на структурах гломерул. При первичной форме депозиция должна происходить, по-видимому, за счет Fc-рецепторов ткани [65]; во втором случае посредником служит Fc α -связывающий Agr белок СГА [106]. За рамками нашей работы открытым остается вопрос о том имеется ли в депозитах почечных гломерул дефектный IgA? Его присутствие позволило бы с большим основанием считать предлагаемую модель полностью соответствующей IgA-нефропатии человека.

Напомним, что IgA1 имеется только у человека и приматов, но не у других видов животных. Поэтому при моделировании на кроликах IgAN речь всегда будет идти не об IgA1, а лишь об IgA, хотя присутствие аномального IgA в организме экспериментального животного нельзя исключить при дисбиозе и нарушении иммунитета слизистых оболочек. Ранее были описаны опыты

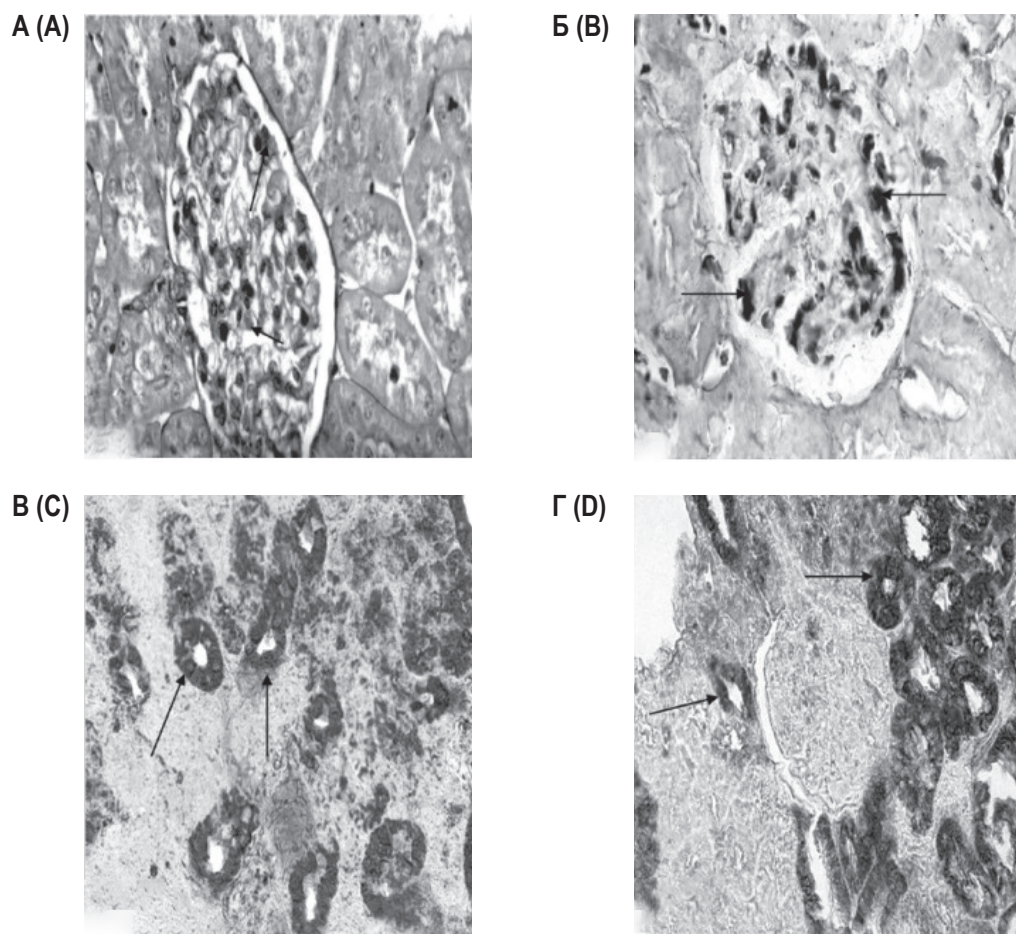


Рисунок 3. Иммуноморфологические изменения в корковом и мозговом веществе почки кролика, индуцированные *S. pyogenes* типа M 60 [3]

Примечание. А, Б – депозиты IgA в мезангиальных клетках почечного клубочка (стрелки); В – отложение C3-компонентов комплемента в клетках канальцев (стрелки) мозгового слоя почки; Г – отложение C3-компонентов комплемента в клетках проксимальных канальцев (стрелки), окружающих почечный клубочек в корковом веществе. А, Б, В, Г – иммуногистохимическая окраска, $\times 750$.

Figure 3. Immunomorphological changes in the cortical and medullary substances of the rabbit kidney induced by *S. pyogenes* type M 60 [3]

Note. A, B, deposits of IgA in the mesangial cells of the renal glomeruli (arrows); C, deposition of C3 complement components in the cells of the tubules (arrows) of the medullary layer of the kidney; D, deposition of C3 complement components in the cells of the proximal tubules (arrows) surrounding the renal glomerulus in the cortical substance. A, B, C, D, immunohistochemical staining, $\times 750$.

на грызунах, в которых удавалось воспроизводить признаки истинной IgAN, например, синтез галактозо-дефицитных IgA, их депозицию в мезангиуме и характерное поражение гломерул. Следует указать на модель IgAN на крысах [118], в том числе с использованием вируса парагриппа [61]. Созданы эффективные модели IgAN на мышах, в которых процесс определялся синтезом дефектных по галактозе IgA [94, 111]. Именно на мышинной модели были показаны механизмы формирования IgA-содержащих комплексов и их отложения в мезангиуме. Речь идет об участии в этих реакциях аномального IgA, растворимого

белка CD89, рецептора трансферрина и фермента трансглутаминазы [17, 18].

Представляют интерес работы, связанные с патологией лимфоидной ткани глотки и гортани у человека [14, 73], авторы которых обнаружили наличие дефектных IgA1 не только в сыворотке, но и в тонзиллярных лимфоцитах.

Анализ обширных данных допускает, что патология почек, развивающаяся как следствие СГА-инфекций, может изучаться на моделях животных, сопоставимых с PSGN и IgAN человека. Первый процесс инициируется Fc γ -рецепторными М-белками, а второй – Fc α -рецепторными белками СГА. При этом, PSGN

чаще протекает как мембранозно-пролиферативный процесс, вызванный отложением иммунных комплексов в капсуле почечных клубочков. Между тем, для IgAN типичен мезангиально-пролиферативный процесс, обусловленный отложением Fc α -связывающего белка в мезангиальных клетках гломерул. Рассмотренные данные подчеркивают важность выдвигаемых представлений об актуальности феномена неиммунного связывания иммуноглобулинов G и A при осложнениях стрептококковой инфекции, даже для различающихся патологических процессов.

Заключение

Стрептококка группы A разных M-типов обладают способностью неиммунно связывать IgG, IgA и иммунные комплексы человека и некоторых млекопитающих. Изучение данного феномена у *S. pyogenes* представляет несомненный научный интерес как в плане изучения патогенных свойств данного возбудителя, так и при изучении патогенеза аутоиммунных последствий стрептококковой инфекции. С этой целью моделирование указанных процессов на кроликах является наиболее целесообразным подходом, поскольку имеет ряд преимуществ. В отличие от мышинного IgG, который не связывается с M- и M-подобными белками, кроличий IgG обладает такой активностью, хотя и в меньшей степени, чем IgG человека. Поскольку распространение СГА-инфекций ограничено человеческой популяцией, нельзя ожидать, что у неиммунизированных кроликов будут антитела к СГА, способные

повлиять на исследование аутоиммунных осложнений, подобных стрептококковому гломерулонефриту или миокардиту. Кроме того, в обычных условиях у кроликов отсутствуют аутоантитела к собственным иммуноглобулинам, что служит удобным фоном для иммуноморфологических исследований соответствующих тканей при стрептококковой патологии.

Исследования с целью определения инициирующих факторов в патологии, всегда актуальны, поскольку направляют мысль на поиск средств и методов терапевтической и профилактической направленности, особенно в случаях, когда ее причина неизвестна или спорна. Условия или факторы, которые определяют переход инфекции в осложнение, должны рассматриваться как инициирующие, а эффективность лечебных и профилактических мер может служить критерием результативности исследования. Применительно к СГА-инфекции, внимания заслуживает иммуноглобулин-связывающая функция M-белков и использование препаратов IgG и их Fc-фрагментов для подавления перехода инфекции в осложнение. Актуальность вопроса определяет необходимость дальнейшего изучения самого феномена неиммунного связывания и частных аспектов проблемы; к примеру, механизмов индукции гломерулонефрита или миокардита рекомбинантными M- и M-подобными белками *S. pyogenes*, а также патогенеза IgA-нефропатии стрептококковой природы, для подтверждения инициирующей роли Fc-рецепторных белков СГА в развитии указанных осложнений.

Список литературы / References

1. Бурова Л.А., Гаврилова Е.А., Пигаревский П.В., Тотолян Артем А. Роль стрептокиназы в моделировании постстрептококкового гломерулонефрита // Инфекция и иммунитет, 2021. Т. 11, № 5. С. 853-864. [Burova L.A., Gavrilova E.A., Pigarevsky P.V., Totolian Artem A. Role of streptokinase in experimental streptococcal glomerulonephritis. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2021, Vol. 11, no. 5, pp. 853-864. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-ARO-1594.
2. Бурова Л.А., Пигаревский П.В., Снегова В.А., Тотолян А.А. Влияние Fc-фрагментов нормального иммуноглобулина G на развитие гломерулонефрита, индуцированного штаммами *Streptococcus pyogenes* // Инфекция и иммунитет, 2020. Т. 10, № 1 С. 55-63. [Burova L.A., Pigarevsky P.V., Snegova V.A., Totolian A.A. Influence of Fc fragments of normal immunoglobulin G on the development of glomerulonephritis induced by *Streptococcus pyogenes* strains. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2020, Vol. 10, no. 1, pp. 55-63. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-IOI-1226.
3. Бурова Л.А., Пигаревский П.В., Снегова В.А., Дуплик Н.В., Шален К., Тотолян А.А. Нефритогенность IgA-связывающих *Streptococcus pyogenes*. Моделирование IgA-гломерулонефрита // Медицинская иммунология, 2016. Т. 18, № 3. С. 221-230. [Burova L.A., Pigarevsky P.V., Snegova V.A., Duplik N.V., Schalen K., Totolian Artem A. Nephritogenic activity of IgA-binding *Streptococcus pyogenes*. An experimental model of IgA glomerulonephritis. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2016, Vol. 18, no. 3, pp. 221-230. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2016-3-221-230.
4. Бурова Л.А., Пигаревский П.В., Снегова В.А., Кулешевич Е.В., Жарков Д.А., Шален С., Тотолян А.А. Нефритогенная активность *Streptococcus pyogenes* генотипов emm1 и emm12, различающихся по источнику выделения // Инфекция и иммунитет, 2015. Т. 5, № 3. С. 233-242. [Burova L.A., Pigarevsky P.V., Snegova V.A., Kuleshevich E.V., Zharkov D.A., Schalen C., Totolian A.A. Nephritogenic activity of *Streptococcus pyogenes*

genotypes emm1 and emm12, differing by the source of isolation. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2015, Vol. 5, no. 3, pp. 233-242. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-2015-3-233-242.

5. Бурова Л.А., Кристенсен П., Грубб Р., Шален К., Огурцов Р.П. Индукция синтеза антииммуноглобулинов при иммунизации кроликов стрептококками группы А // Вестник АМН СССР, 1986. № 7. С. 63-70. [Burova L.A., Christensen P., Grubb R., Schalen C., Ogurtzov R.P. Induction of antiimmunoglobulin synthesis during immunization of rabbits with group A streptococci. *Vestnik AMN SSSR = Bulletin of the USSR Academy of Medical Sciences*, 1986, no. 7, pp. 63-70. (In Russ.)]

6. Тотолян Артем А., Бурова Л.А., Пигаревский П.В. Экспериментальный постстрептококковый гломерулонефрит. СПб.: Человек, 2019. 108 с. [Totolian Artem A., Burova L.A., Pigarevsky P.V. Experimental post-streptococcal glomerulonephritis]. St. Petersburg: Chelovek, 2019. 108 p.

7. Тотолян Артем А., Бурова Л.А. Fc-рецепторные белки *Streptococcus pyogenes* и патогенез постинфекционных осложнений (критический обзор) // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии, 2014. № 3. С. 78-91. [Totolian Artem A., Burova L.A. Fc-receptor proteins of *Streptococcus pyogenes* and the pathogenesis of post-infection complications (critical review). *Zhurnal mikrobiologii epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2014, no. 3, pp. 78-91. (In Russ.)]

8. Тотолян Артем А., Бурова Л.А., Нагорнев В.А., Пигаревский П.В. Анализ механизмов развития иммунопатологического острого постстрептококкового гломерулонефрита (AGN) // Терапевтический архив, 2008. Т. 80, № 6. С. 90-95. [Totolian Artem A., Burova L.A., Nagornev V.A., Pigarevsky P.V. Analysis of mechanisms of development of immunopathological post-streptococcal glomerulonephritis (APSGN). *Terapevticheskiy arkhiv = Therapeutic Archive*, 2008, no. 6, pp. 90-95. (In Russ.)]

9. Akesson P., Schmidt K.H., Cooney J., Björck L. M1 protein and protein H: IgG-Fc- and albumin-binding streptococcal surface proteins encoded by adjacent genes. *Biochem. J.*, 1994, Vol. 300, Pt 3, pp. 877-886.

10. Almroth G., Lindell A., Aselius H., Sörén L., Svensson L., Hultman P., Eribe E.R., Olsen I. Acute glomerulonephritis associated with *streptococcus pyogenes* with concomitant spread of *Streptococcus constellatus* in four rural families. *Ups. J. Med. Sci.*, 2005, Vol. 110, no. 3, pp. 217-231.

11. Balter S., Benin A., Pinto S.W., Teixeira L.M., Alvim G.G., Luna E., Jackson D., LaClaire L., Elliott J., Facklam R., Schuchat A. Epidemic nephritis in Nova Serrana, Brazil. *Lancet*, 2000, Vol. 355, no. 9217, pp. 1776-1780.

12. Barabas A.Z., Cole C.D., Lafreniere R., Weir D.M. Immunopathological events initiated and maintained by pathogenic IgG autoantibodies in an experimental autoimmune kidney disease. *Autoimmunity*, 2012, Vol. 45, no. 7, pp. 495-509.

13. Barnham M., Thornton T.J., Lange K. Nephritis caused by *Streptococcus zooepidemicus* (Lancefield group C). *Lancet*, 1983, no. 1, pp. 945-948.

14. Barratt J., Smith A.C., Feehally J. The pathogenic role of IgA1 O-linked glycosylation in the pathogenesis of IgA nephropathy. *Nephrology (Carlton)*, 2007. Vol. 12, no. 3, pp. 275-284.

15. Berge A., Sjöbring U. PAM, a novel plasminogen-binding protein from *Streptococcus pyogenes*. *J. Biol. Chem.*, 1993, Vol. 268, no. 34, pp. 25417-25424.

16. Berggard K., Johnsson E., Morfeldt E., Persson J., Stalhammar-Carlemalm M., Lindahl G. Binding of human C4BP to the hypervariable region of M protein: a molecular mechanism of phagocytosis resistance in *Streptococcus pyogenes*. *Mol. Microbiol.*, 2001, Vol. 42, no. 2, pp. 539-551.

17. Berthelot L., Monteiro R.C. Formation of IgA deposits in Berger's disease: what we learned from animal models. *Biol. Aujourd'hui*, 2013, Vol. 207, no. 4, pp. 241-247.

18. Berthelot L., Papista C., Maciel T.T., Biarnes-Pelicot M., Tissandie E., Wang P.H., Tamouza H., Jamin A., Bex-Coudrat J., Gestin A., Boumediene A., Arcos-Fajardo M., England P., Pillebout E., Walker F., Daugas E., Vrtosvnik F., Flamant M., Benhamou M., Cogné M., Moura I.C., Monteiro R.C. Transglutaminase is essential for IgA nephropathy development acting through IgA receptors. *J. Exp. Med.*, 2012, Vol. 209, no. 4, pp. 793-806.

19. Bessen D.E. Localization of immunoglobulin A-binding sites within M or M-like proteins of group A streptococci. *Infect. Immun.*, 1994, Vol. 62, no. 5, pp. 1968-1974.

20. Boyd J.K., Cheung C.K., Molyneux K., Feehally J., Barratt J. An update on the pathogenesis and treatment of IgA nephropathy. *Kidney Int.*, 2012, Vol. 81, no. 9, pp. 833-843.

21. Buffalo C.Z., Bahn-Suh A.J., Hirakis S.P., Biswas T., Amaro R.E., Nizet V., Ghosh P. Conserved patterns hidden within group A *Streptococcus* M protein hypervariability recognize human C4b-binding protein. *Nat. Microbiol.*, 2016, Vol. 1, no. 11, 16155. doi: 10.1038/nmicrobiol.2016.155.

22. Бурова Л., Пигаревский П., Дуплик Н., Снегова В., Суворов А., Шален К., Тотолян Артем. Immune complex binding *Streptococcus pyogenes* type M12/emm12 in experimental glomerulonephritis. *JMM*, 2013, Vol. 62, Pt 9, pp. 1272-1280.

23. Бурова Л.А., Пигаревский П.В., Селиверстова В.Г., Гупалова Т.В., Шален К., Тотолян А.А. Experimental poststreptococcal glomerulonephritis elicited by IgG Fc-binding M family proteins and blocked by IgG Fc-fragment. *APMIS*, 2012, Vol. 120, pp. 359-362.

24. Бурова Л.А., Гаврилова Е.А., Гупалова Т.В., Пигаревский П.В., Нагорнев В.А., Грубб Р., Шален К., Тотолян А.А. Inhibition of experimental post-streptococcal glomerulonephritis in rabbits by IgG Fc fragments. In: *Streptococci – New Insights into an Old Enemy* (Ed. K.S. Sriprakash). Published by Elsevier B.V., ICS, 2006, Vol. 1289, pp. 359-362.

25. Burova L. A., Nagornev V. A., Pigarevsky P. V., Gladilina M. M., Gavrilova E. A., Seliverstova V. G., Totolian A. A., Thern A., Schalen C. Myocardial tissue damage in rabbits injected with group A streptococci, types M1 and M22. Role of bacterial immunoglobulin-binding surface proteins. *APMIS*, 2005. Vol. 113, pp. 21-30.
26. Burova L. A., Nagornev V. A., Pigarevsky P. V., Gladilina M. M., Molchanova I. V., Gavrilova E. A., Seliverstova V. G., Totolian A. A., Thern A., Schalen C. Induction of myocarditis in rabbits injected with group A streptococci. *Indian J. Med. Res.*, 2004, Vol. 119 (Suppl.), pp. 183-184.
27. Burova L., Therne A., Pigarevsky P., Gladilina M., Seliverstova V., Gavrilova E., Nagornev V., Schalen C., Totoian Artem. Role of group A streptococcal IgG-binding proteins in triggering experimental glomerulonephritis in the rabbit. *APMIS*, 2003, Vol. 111, pp. 955-962.
28. Burova L. A., Nagornev V. A., Pigarevsky P. V., Gladilina M. M., Seliverstova V. G., Schalen C., Totolian A. A. Triggering of renal tissue damage in the rabbit by IgG Fc-receptor positive group A streptococci. *APMIS*, 1998, Vol. 106, pp. 277-287.
29. Burova L. A., Koroleva I. V., Ogurtzov R. P., Murashov S. V., Svensson M.-L., Schalen C. Role of streptococcal IgG Fc-receptor in tissue deposition of IgG in rabbits immunized with *Streptococcus pyogenes*. *APMIS*, 1992, Vol. 100, pp. 567-574.
30. Burova L. A., Schalen C., Koroleva I. V., Svensson M.-L. Role of group A streptococcal IgG Fc-receptor in induction of anti-IgG by immunization in rabbit. *FEMS Microbiol. Immunol.*, 1989, Vol. 47, pp. 443-448.
31. Burova L. A., Christensen P., Grubb R., Schalen C., Svensson M.-L., Beltukov P. P., Totolian Artem A. Anti-immunoglobulins in experimental streptococcal immunization: relation to bacterial growth conditions and Fc-receptors. *Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.*, 1985, Vol. 93, no. 1, pp. 19-23.
32. Carapetis J. R., Beaton A., Cunningham M. W., Guilherme L., Karthikeyan G., Mayosi B. M., Sable C., Steer A., Wilson N., Wyber R., Zühlke L. Acute rheumatic fever and rheumatic heart disease. *Nat. Rev. Dis. Primers*, 2016, Vol. 2, 15084. doi: 10.1038/nrdp.2015.84.
33. Carapetis J. R., Steer A. C., Mulholland E. K., Weber M. The global burden of group A streptococcal diseases. *Lancet Infect. Dis.*, 2005, Vol. 5, no. 11, pp. 685-694.
34. Carlsson F., Sandin C., Lindahl G. Human fibrinogen bound to *Streptococcus pyogenes* M protein inhibits complement deposition via the classical pathway. *Mol. Microbiol.*, 2005, Vol. 56, no. 1, pp. 28-39.
35. Cedervall T., Johansson M. U., Akerstrom B. Coiled-coil structure of group A streptococcal M proteins. Different temperature stability of class A and C proteins by hydrophobic-nonhydrophobic amino acid substitutions at heptad positions a and d. *Biochemistry*, 1997, Vol. 36, no. 16, pp. 4987-4994.
36. Cedervall T., Akesson P., Stenberg L., Herrmann A., Akerstrom B. Allosteric and temperature effects on the plasma protein binding by streptococcal M protein family members. *Scand. J. Immunol.*, 1995, Vol. 42, no. 4, pp. 433-441.
37. Christensen P., Sramec J., Zatterstrom U. Binding of aggregated IgG in the presence of fresh serum: strong association with type 12 group A streptococci. Absence of binding among nephritogenic type 49 strains. *APMIS*, 1981, Vol. 89, no. 2, pp. 87-91.
38. Christensen P., Oxelius V.-A. A reaction between some streptococci and IgA myeloma proteins. *Acta Path. Microbiol. Scand., Sect. C*, 1975, Vol. 83, pp. 184-188.
39. Cole J. N., McArthur J. D., McKay F. C., Sanderson-Smith M. L., Cork A. J., Ranson M., Rohde M., Itzek A., Sun H., Ginsburg D., Kotb M., Nizet V., Chhatwal G. S., Walker M. J. Trigger for group A streptococcal M1T1 invasive disease. *FASEB J.*, 2006, Vol. 20, no. 10, pp. 1745-1747.
40. Collin M., Olsén A. Effect of SpeB and EndoS from *Streptococcus pyogenes* on human immunoglobulins. *Infect. Immun.*, 2001, Vol. 69, no. 11, pp. 7187-7189.
41. Collin M., Olsén A. EndoS, a novel secreted protein from *Streptococcus pyogenes* with endoglycosidase activity on human IgG. *EMBO J.*, 2001, Vol. 20, no. 12, pp. 3046-3055.
42. Coppo R. The intestine-renal connection in IgA nephropathy. *Nephrol. Dial. Transplant.*, 2015, Vol. 30, no. 3, pp. 360-366.
43. Cu G. A., Mezanno S., Bannan J. D., Zabriskie J. B. Immunohistochemical and serological evidence for the role of streptococcal proteinase in acute post-streptococcal glomerulonephritis. *Kidney Int.*, 1998, Vol. 54, no. 3, pp. 819-826.
44. Cunningham M. W. Molecular mimicry, autoimmunity, and infection: the cross-reactive antigens of group A Streptococci and their sequelae. *Microbiol. Spectr.*, 2019, Vol. 7, no. 4, 10.1128/microbiolspec. GPP3-0045-2018. doi: 10.1128/microbiolspec.GPP3-0045-2018.
45. Cunningham M. W. Pathogenesis of group A streptococcal infections. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2000, Vol. 13, no. 3, pp. 470-511.
46. Ermer D., Weckel A., Agarwal V., Frick I. M., Bjorck L., Blom A. M. Binding of complement inhibitor C4b-binding protein to a highly virulent *Streptococcus pyogenes* M1 strain is mediated by protein H and enhances adhesion to and invasion of endothelial cells. *J. Biol. Chem.*, 2013, Vol. 288, no. 45, pp. 32172-32183.
47. Facklam R., Beall B., Efstratiou A., Fischetti V., Johnson D., Kaplan E., Kriz P., Lovgren M., Martin D., Schwartz B., Totolian A., Bessen D., Hollingshead S., Rubin F., Scott J., Tyrrell G. *emm* typing and validation of provisional M types for group A streptococci. *Emerg. Infect. Dis.*, 1999, no. 5, pp. 247-253.
48. Forsgren A., Sjoquist J. "Protein A" from *S. aureus*. I. Pseudoimmune reaction with human gamma-globulin. *J. Immunol.*, 1966, Vol. 97, no. 6, pp. 822-827.

49. Ghosh P. Variation, Indispensability, and masking in the M protein. *Trends Microbiol.*, 2018, Vol. 26, no. 2, pp. 132-144.
50. Gomes-Guerrero C., Duque N., Casado M.T., Pastor C., Blanco J., Mampaso F., Vivanco F., Egido J. Administration of IgGFc-fragments prevents glomerular injury in experimental immune complex nephritis. *J. Immunol.*, 2000, Vol. 164, no. 4, pp. 2091-2101.
51. Gorton D., Sikder S., Williams N.L., Chilton L., Rush C.M., Govan B.L., Cunningham M.W., Ketheesan N. Repeat exposure to group A streptococcal M protein exacerbates cardiac damage in a rat model of rheumatic heart disease. *Autoimmunity*, 2016, Vol. 49, no. 8, pp. 563-570.
52. Grov A., Myklestd B., Oeding F. Immunochemical studies on antigen preparations from *Staphylococcus aureus*. 1. Isolation and chemical characterization of antigen A. *Acta Path. Microb. Scand.*, 1964, Vol. 61, pp. 588-596.
53. Grubb R., Burova L., Hultquist R., Schalen C., Totolian A. Anti-IgG-allotypic specificities of spontaneously occurring anti-immunoglobulins. In: "Antibodies-protective, destructive and regulatory role" (Eds. Milgrome F., Abeyounis C., Albin B.), Karger, Basel, 1985, pp. 224-233.
54. Haanes E.J., Heath D.G., Cleary P.P. Architecture of the vir regulons of group A streptococci parallels opacity factor phenotype and M protein class. *J. Bacteriol.*, 1992, Vol. 174, no. 15, pp. 4967-4976.
55. Hashimoto A., Suzuki Y., Suzuki H., Ohsawa I., Brown R., Hall S., Tanaka Y., Novak J., Ohi H., Tomino H. Determination of severity of murine IgA nephropathy by glomerular complement activation by aberrantly glycosylated IgA and immune complexes. *Am. J. Pathol.*, 2012, Vol. 181, no. 4, pp. 1338-1347.
56. Hollingshead S.K., Arnold J., Readdy T.L., Bessen D.E. Molecular evolution of a multigene family in group A *Streptococci*. *Mol. Biol. Evol.*, 1994, Vol. 11, no. 2, pp. 208-219.
57. Hollingshead S.K., Readdy T.L., Yung D.L., Bessen D.E. Structural heterogeneity of the emm gene cluster in group A streptococci. *Mol. Microbiol.*, 1993, Vol. 8, no. 4, pp. 707-717.
58. Honda-Ogawa M., Ogawa T., Terao Y., Sumitomo T., Nakata M., Ikebe K., Maeda Y., Kawabata S. Cysteine proteinase from *Streptococcus pyogenes* enables evasion of innate immunity via degradation of complement factors. *J. Biol. Chem.*, 2013, Vol. 288, no. 22, pp. 15854-15864.
59. Horton R.E., Vidarsson G. Antibodies and their receptors: different potential roles in mucosal defense. *Front. Immunol.*, 2013, Vol. 4, 200. doi: 10.3389/fimmu.2013.00200.
60. Huang J., Xie X., Lin Z.F., Luo M.Q., Yu B.Y., Gu J.R. Induction of myocarditis lesions in Lewis rats by formalin-killed cells of group A *Streptococcus*. *J. Int. Med. Res.*, 2009, Vol. 37, no. 1, pp. 175-181.
61. Jessen R.H., Emancipator S.N., Jacobs G.H., Nedrud J.G. Experimental IgA-IgG nephropathy induced by a viral respiratory pathogen. Dependence on antigen form and immune status. *Lab. Invest.*, 1992, Vol. 67, no. 3, pp. 379-386.
62. Johnsson E., Andersson G., Lindahl G., Heden L.O. Identification of the IgA-binding region in streptococcal protein Arp. *J. Immunol.*, 1994, Vol. 153, no. 8, pp. 3557-3564.
63. Katerov V., Andreev A., Schalen C., Totolian A. Protein F, a fibronectin-binding protein of *Streptococcus pyogenes*, also binds human fibrinogen: isolation of the protein and mapping of the binding region. *Microbiology (Reading)*, 1998, Vol. 144, Pt 1, pp. 119-126.
64. Kollman J.M., Pandi L., Sawaya M.R., Riley M., Doolittle R.F. Crystal structure of human fibrinogen. *Biochemistry*, 2009, Vol. 48, no. 18, pp. 3877-3886.
65. Kovalenko P., Fujinaka H., Yoshida Y., Kawamura H., Qu Z., El-Shemi A., Li H., Matsuki A., Bilim V., Yaoita E., Abo T., Uchiyama M., Yamamoto T. Fc receptor-mediated accumulation of macrophages in crescentic glomerulonephritis induced by anti-glomerular basement membrane antibody administration in WKY rats. *Int. Immunol.*, 2004, Vol. 16, no. 5, pp. 625-634.
66. Kronvall G. A surface component in group A, C and G streptococci with non-immune reactivity for immunoglobulin G. *J. Immunol.*, 1973, Vol. 111, no. 5, pp. 1401-1406.
67. Kronvall G., Bjorck L., Myhre E.B., Wannamaker L.W. Binding of aggregated β_2 -microglobulin, IgG, IgA and fibrinogen to group A, C and G streptococci with special reference to streptococcal M protein. In: "Pathogenic streptococci" (Ed. Parker M.T.) Reedbooks Ltd, England, 1979, pp. 74-76.
68. Lebrun L., Pillot J., Grangeot-Keros L. Significance of anti-IgG antibodies obtained by immunization of rabbits with same streptococcal strains. *Ann. Inst. Pasteur Immunol.*, 1982, Vol. 133, pp. 45-56.
69. Li Y., Heuser J.S., Kosanke S.D., Hemri M., Cunningham M. W. Cryptic epitope identified in rat and human cardiac myosin S2 region induces myocarditis in the Lewis rat. *J. Immunol.*, 2004, Vol. 172, no. 5, pp. 3225-3234.
70. Lindahl G. An Odyssey in word of M proteins. In: Perspectives on receptors and resistance (Ed. Kronvall G.), Stockholm, 2013, pp. 13-23.
71. Lindahl G., Stenberg L. Binding of IgA and/or IgG is a common property among clinical isolates of group A streptococci. *Epidemiol. Infect.*, 1990, Vol. 105, no.1, pp. 87-93.
72. Lindahl G., Akerstrom B. Receptor for IgA in group A streptococci: cloning of the gene and characterization of the protein expressed in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.*, 1989, Vol. 3, no. 2, pp. 239-247.
73. Liu H., Peng Y., Liu F., Xiao W., Zhang Y., Li W. Expression of IgA class switching gene in tonsillar mononuclear cells in patients with IgA nephropathy. *Inflamm. Res.*, 2011, Vol. 60, no. 9, pp. 869-878.
74. Luo Y.H., Kuo C.F., Huang K.J., Wu J.J., Lei H.-Y., Lin M.T., Chuang W.-J., Liu C.-C., Lin C.-F., Lin Y.-S. Streptococcal pyrogenic exotoxin B antibodies in a mouse model of glomerulonephritis. *Kidney Int.*, 2007, Vol. 72, no. 6, pp. 716-724.

75. Ly D., Taylor J.M., Tsatsaronis J.A., Monteleone M.M., Skora A.S., Donald C.A., Maddocks T., Nizet V., West N.P., Ranson M., Walker M.J., McArthur J.D., Sanderson-Smith M.L. Plasmin(ogen) acquisition by group A *Streptococcus* protects against C3b-mediated neutrophil killing. *J. Innate Immun.*, 2014, Vol. 6, no. 2, pp. 240-250.
76. Macheboeuf P., Buffalo C., Fu C.Y., Zinkernagel A.S., Cole J.N., Johnson J.E., Nizet V., Ghosh P. Streptococcal M1 protein constructs a pathological host fibrinogen network. *Nature*, 2011, Vol. 472, no. 7341, pp. 64-68.
77. Maharaj S., Seegobin K., Chrzanowski S., Chang S. Acute glomerulonephritis secondary to *Streptococcus anginosus*. *BMJ Case Rep.*, 2018, Vol. 2018, bcr2017223314. doi: 10.1136/bcr-2017-223314.
78. Maixnerova D., Reily C., Bian Q., Neprasova M., Novak J., Tesar V. Markers for the progression of IgA nephropathy. *J. Nephrol.*, 2016, Vol. 29, no. 4, pp. 535-541.
79. McIntosh R.M., Allen J.E., Rabideau D., Carcio R., Rubio L., Rodriues-Iturbe B. The role of interaction between streptococcal products and immunoglobulins in the pathogenesis of glomerular and vascular injury. In: "Streptococcal diseases and the immune response" (Eds. Read S.E., Zabriskie J.B.), New York, London Academic Press, 1980, pp. 585-596.
80. McIntosh R.M., Kaufman D.B., McIntosh J.R., Griswold W.R. Glomerular lesions produced in rabbits by autologous serum and autologous IgG modified by treated with a culture of a β -hemolytic streptococcus. *J. Med. Microbiol.*, 1972, Vol. 5, no. 1, pp. 1-7.
81. McIntosh R.M., Kulvinskis C., Kaufman D.B. Alteration of the chemical composition of human immunoglobulin G by *Streptococcus pyogenes*. *J. Med. Microbiol.*, 1971, Vol. 4, no. 4, pp. 535-538.
82. McMillan D.J., Dreze P.A., Vu T., Bessen D.E., Guglielmini J., Steer A.C., Carapetis J.R., van Melder L., Sriprakash K.S., Smeesters P.R. Updated model of group A *Streptococcus* M proteins based on a comprehensive worldwide study. *Clin. Microbiol. Infect.*, 2013, Vol. 19, no. 5, pp. 222-229.
83. McNamara C., Zinkernagel A.S., Macheboeuf P., Cunningham M.W., Nizet V., Ghosh P. Coiled-coil irregularities and instabilities in group A *Streptococcus* M1 are required for virulence. *Science*, 2008, Vol. 319, no. 5868, pp. 1405-1408.
84. Meng H., Ohtake H., Ishida A., Ohta N., Kakehata S., Yamakawa M. IgA production and tonsillar focal infection in IgA nephropathy. *J. Clin. Exp. Hematop.*, 2012, Vol. 52, no. 3, pp. 161-170.
85. Mills J.O., Ghosh P. Nonimmune antibody interactions of Group A *Streptococcus* M and M-like proteins. *PLoS Pathog.*, 2021, Vol. 17, no. 2, e1009248. doi: 10.1371/journal.ppat.1009248.
86. Moriyama T., Tanaka K., Iwasaki C., Oshima Y., Ochi A., Kataoka H., Itabashi M., Takei T., Uchida K., Nitta K. Prognosis in IgA nephropathy: 30-year analysis of 1012 patients at a single center in Japan. *PLoS One*, 2014, Vol. 9, no. 3, e91756. doi: 10.1371/journal.pone.0091756.
87. Myhre E.B., Kronvall G. Immunoglobulin binding to group A, C and G streptococci. In: "Pathogenic streptococci" (ed. Parker M.T.) Reedbooks Ltd, England, 1979, pp. 76-78.
88. Myhre E.B., Kronvall G. Heterogeneity of nonimmune immunoglobulin Fc reactivity among gram-positive cocci. Description of three major types of receptors for human immunoglobulin G. *Infect. Immun.*, 1977, Vol. 17, no. 3, pp. 475-482.
89. Nakata J., Suzuki Y., Suzuki H., Sato D., Kano T., Yanagawa H., Matsuzaki K., Horikoshi S., Novak J., Tomino Y. Changes in nephritogenic serum galactose-deficient IgA1 in IgA nephropathy following tonsillectomy and steroid therapy. *PLoS One*, 2014, Vol. 9, no. 2, e89707. doi: 10.1371/journal.pone.0089707.
90. Nilson B.H., Frick I.M., Akesson P., Forsen S., Bjorck L., Akerstrom B., Wikström M. Structure and stability of protein H and the M1 protein from *Streptococcus pyogenes*. Implications for other surface proteins of gram-positive bacteria. *Biochemistry*, 1995, Vol. 34, no. 41, pp. 13688-13698.
91. Nordstrand A., McShan W.M., Ferretti J.J., Holm S.E., Norgren M. Allele substitution of the streptokinase gene reduces the nephritogenic capacity of Group A streptococcal strain NZ131. *Infect. Immun.*, 2000, Vol. 68, no. 3, pp. 1019-1025.
92. Nordstrand A., Norgren M., Ferretti J.J., Holm S.E. Streptokinase as a mediator of acute post-streptococcal glomerulonephritis in an experimental mouse model. *Infect. Immun.*, 1998, Vol. 66, no. 1, pp. 315-321.
93. Nordstrand A., Norgren M., Holm S.E. An experimental model for acute glomerulonephritis in mice. *APMIS*, 1996, Vol. 104, pp. 805-816.
94. Okazaki K., Suzuki Y., Otsuji M., Suzuki H., Kihara M., Kajiyama T., Hashimoto A., Nishimura H., Brown R., Hall S., Novak J., Izui S., Hirose S., Tomino Y. Development of a model of early-onset IgA Nephropathy. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 2012, Vol. 23, no. 8, pp. 1364-1374.
95. Phillips G.N. Jr., Flicker P.F., Cohen C., Manjula B.N., Fischetti V.A. Streptococcal M protein: alpha-helical coiled-coil structure and arrangement on the cell surface. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 1981, Vol. 78, no. 8, pp. 4689-4693.
96. Phillips J., Palmer A., Baliga R. Glomerulonephritis associated with acute pneumococcal pneumonia: a case report. *Pediatr. Nephrol.*, 2005, Vol. 20, no. 10, pp. 1494-1495.
97. Piccolo M., de Angelis M., Lauriero G., Montemurno E., di Cagno R., Gobbetti M. Salivary microbiota associated with immunoglobulin A nephropathy. *Microb. Ecol.*, 2015, Vol. 70, no. 2, pp. 557-565.
98. Rafee R.A.M., Sikder S., Hamlin A.S., Andronicos N.M., McMillan D.J., Sriprakash K.S. Natkunam ketheesan requirements for a robust animal model to investigate the disease mechanism of autoimmune complications associated with ARF/RHD. *Front. Cardiovasc. Med.*, 2021, Vol. 8, 675339. doi: 10.3389/fcsm.2021.675339.

99. Ringdahl U., Svensson H.G., Kotarsky H., Gustafsson M., Weineisen M., Sjöbring U. A role for the fibrinogen-binding regions of streptococcal M proteins in phagocytosis resistance. *Mol. Microbiol.*, 2000, Vol. 37, no. 6, pp. 1318-1326.
100. Rios-Steiner J.L., Schenone M., Mochalkin I., Tulinsky A., Castellino F.J. Structure and binding determinants of the recombinant kringle-2 domain of human plasminogen to an internal peptide from a group A Streptococcal surface protein. *J. Mol. Biol.*, 2001, Vol. 308, no. 4, pp. 705-719.
101. Rodriguez-Iturbe B. Autoimmunity in acute poststreptococcal GN: A neglected aspect of the disease. *JASN*, 2021, Vol. 32, no. 3, pp. 534-542.
102. Rodriguez-Iturbe B., Haas M. Post-Streptococcal glomerulonephritis. In: *Streptococcus pyogenes: Basic biology to clinical manifestations* [Internet]. Oklahoma City (OK): University of Oklahoma Health Sciences Center; 2016.
103. Rodriguez-Iturbe B., Musser J.M. The current state of poststreptococcal glomerulonephritis. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 2008, Vol. 19, no. 10, pp. 1855-1864.
104. Sandin C., Carlsson F., Lindahl G. Binding of human plasma proteins to *Streptococcus pyogenes* M protein determines the location of opsonic and non-opsonic epitopes. *Mol. Microbiol.*, 2006, Vol. 59, no. 1, pp. 20-30.
105. Schalen C., Kurl D.N., Christensen P. Independent binding of native and aggregated IgG in group A streptococci. *AMIS*, 1986, Vol. 94, no. 5, pp. 333-338.
106. Schmitt R., Ståhl A., Olin A., Kristoffersson A.-C., Rebetz A., Novak J., Lindahl G., Karpman D. The combined role of galactose-deficient IgA1 and streptococcal IgA-binding M protein in inducing IL-6 and C3 secretion from human mesangial cells: Implications for IgA nephropathy. *J. Immunol.*, 2014, Vol. 193, no. 1, pp. 317-326.
107. Schmitt R., Carlsson F., Mörgelin M., Tati R., Lindahl G., Karpman D. Tissue deposits of IgA-binding streptococcal M proteins in IgA nephropathy and Henoch-Schonlein purpura. *Am. J. Pathol.*, 2010, Vol. 176, no. 2, pp. 608-618.
108. Schroder A.K., Nardella F.A., Mannik M., Johansson P.J., Christensen P. Identification of the site on IgG Fc for interaction with streptococci of groups A, C and G. *Immunology*, 1987, Vol. 62, no. 4, pp. 523-527.
109. Stenberg L., O'Toole P., Lindahl G. Many group A streptococcal strains express two different immunoglobulin-binding proteins, encoded by closely linked genes: characterization of the proteins expressed by four strains of different M-type. *Mol. Microbiol.*, 1992, Vol. 6, no. 9, pp. 1185-1194.
110. Sun H., Ringdahl U., Homeister J.W., Fay W.P., Engleberg N.C., Yang A.Y., Rozek L.S., Wang X., Sjöbring U., Ginsburg D. Plasminogen is a critical host pathogenicity factor for group A streptococcal infection. *Science*, 2004, Vol. 305, no. 5688, pp. 1283-1286.
111. Suzuki H., Suzuki Y., Novak J., Tomino Y. Development of animal models of human IgA Nephropathy. *Drug Discov. Today Dis. Models*, 2014, no. 11, pp. 5-11.
112. Suzuki H., Kiryluk K., Novak J., Moldoveanu Z., Herr A.B., Renfrow M.B., Wyatt R.J., Scolari F., Mestecky J., Gharavi A.G., Bruce A.J. The Pathophysiology of IgA Nephropathy. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 2011, Vol. 22, pp. 1795-1803.
113. Suzuki H., Fan R., Zhang Z., Brown R., Hall S., Bruce A.J., Chatham W.W., Suzuki Y., Wyatt R.J., Moldoveanu Z., Lee J.Y., Robinson J., Tomana M., Tomino Y., Mestecky J., Novak J. Aberrantly glycosylated IgA1 in IgA nephropathy patients is recognized by IgG antibodies with restricted heterogeneity. *J. Clin. Invest.*, 2009, Vol. 119, no. 6, pp. 1668-1677.
114. Swanson J., Hsu K.C., Gotschlich E.C. Electron microscopic studies on streptococci. I. M antigen. *J. Exp. Med.*, 1969, Vol. 130, no. 5, pp. 1063-1091.
115. Tanaka M., Seki G., Someya T., Nagata M., Fujita T. Aberrantly glycosylated IgA1 as a factor in the pathogenesis of IgA nephropathy. *Clin. Dev. Immunol.*, 2011, Vol. 2011, 470803. doi: 10.1155/2011/470803.
116. Taylor S.N., Sanders C.V. Unusual manifestations of invasive pneumococcal infection. *Am. J. Med.*, 1999, Vol. 107, no. 1A, pp. 12S-27S.
117. Thern A., Stenberg L., Dahlback B., Lindahl G. Ig-binding surface proteins of *Streptococcus pyogenes* also bind human C4b-binding protein (C4BP), a regulatory component of the complement system. *J. Immunol.*, 1995, Vol. 154, no. 1, pp. 375-386.
118. Tian J., Wang Y., Zhou X., Li Y., Wang C., Li J., Li R. Rapamycin slows IgA nephropathy progression in the rat. *Am. J. Nephrol.*, 2014, Vol. 39, no. 3, pp. 218-229.
119. Tomana M., Matousovici K., Julian B.A., Radl J., Konecny K., Mestecky J. Galactose-deficient IgA1 in sera of IgA nephropathy patients is present in complexes with IgG. *Kidney Int.*, 1997, Vol. 52, no. 2, pp. 509-516.
120. Watkins D.A., Johnson C.O., Colquhoun S.M., Karthikeyan G., Beaton A., Bukhman G., Forouzanfar M.H., Longenecker C.T., Mayosi B.M., Mensah G.A., Nascimento B.R., Ribeiro A.L.P., Sable C.A., Steer A.C., Naghavi M., Mokdad A.H., Murray C.J.L., Vos T., Carapetis J.R., Roth G.A. Global, Regional, and National Burden of Rheumatic Heart Disease, 1990-2015. *N. Engl. J. Med.*, 2017, Vol. 377, no. 8, pp. 713-722.
121. Whatmore A.M., Kehoe M.A. Horizontal gene transfer in the evolution of group A streptococcal *emm*-like genes: gene mosaics and variation in *Vir* regulons. *Mol. Microbiol.*, 1994, Vol. 11, no. 2, pp. 363-374.
122. Whitnack E., Beachey E.H. Inhibition of complement-mediated opsonization and phagocytosis of *Streptococcus pyogenes* by D fragments of fibrinogen and fibrin bound to cell surface M protein. *J. Exp. Med.*, 1985, Vol. 162, no. 6, pp. 1983-1997.

123. Wistedt A.C., Ringdahl U., Muller-Esterl W., Sjobring U. Identification of a plasminogen-binding motif in PAM, a bacterial surface protein. *Mol. Microbiol.*, 1995, Vol. 18, no. 3, pp. 569-578.
124. Wyatt R.J., Julian B.A. IgA Nephropathy. *N. Engl. J. Med.*, 2013, Vol. 368, no. 25, pp. 2402-2414.
125. Yang R., Otte M.A., Hellmark T., Collin M., Bjorck L., Zhao M.-H., Daha M.R., Segelmark M. Successful treatment of experimental glomerulonephritis with IdeS and EndoS, IgG-degrading streptococcal enzymes. *Nephrol. Dial. Transplant.*, 2010, Vol. 25, no. 8, pp. 2479-2486.
126. Yoshizawa N., Yamakami K., Fujino M., Oda T., Tamura K., Matsumoto K., Sugisaki T., Boyle M.D.P. Nephritis-associated plasmin receptor and acute poststreptococcal glomerulonephritis: characterization of the antigen and associated immune response. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 2004, Vol. 15, no. 7, pp. 1785-1793.

Авторы:

Бурова Л.А. — д.м.н., ведущий научный сотрудник
отдела молекулярной микробиологии ФГБНУ
«Институт экспериментальной медицины», Санкт-
Петербург, Россия

Суворов А.Н. — д.м.н., член-корреспондент РАН,
руководитель отдела молекулярной микробиологии
ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»,
Санкт-Петербург, Россия

Тотolian Артем А. — д.м.н., академик РАН,
главный научный сотрудник Отдела молекулярной
микробиологии ФГБНУ «Институт экспериментальной
медицины», Санкт-Петербург, Россия

Authors:

Burova L.A., PhD, MD (Medicine), Leading Research
Associate, Department of Molecular Microbiology, Institute
of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Suvorov A.N., PhD, MD (Medicine), Corresponding Member,
Russian Academy of Sciences, Head, Department
of Molecular Microbiology, Institute of Experimental Medicine,
St. Petersburg, Russian Federation

Totolian Artem A., PhD, MD (Medicine), Full Member,
Russian Academy of Sciences, Main Research Associate,
Department of Molecular Microbiology, Institute of
Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Поступила 26.11.2021
Принята к печати 04.01.2022

Received 26.11.2021
Accepted 04.01.2022

ЛЕКАРСТВЕННАЯ ГИПЕРЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ: МЕХАНИЗМЫ ФОРМИРОВАНИЯ И ВОЗМОЖНОСТИ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ

Бычкова Н.В.

ФГБУ «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А.М. Никифорова» Министерства
РФ по делам гражданской обороны, чрезвычайным ситуациям и ликвидации последствий стихийных бедствий,
Санкт-Петербург, Россия

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

Резюме. Постоянный рост частоты встречаемости реакций гиперчувствительности на лекарственные препараты наблюдается во всем мире и вызывает тревогу у врачей всех специальностей. Проблемы диагностики, профилактики и лечения реакций гиперчувствительности обусловлены тем, что, с одной стороны, схожие клинические проявления могут иметь в основе различные патогенетические механизмы, а с другой стороны, клинические симптомы, ответ на терапию и исход заболевания значительно зависят от особенностей состояния пациента. Выделены фенотипы (определяемые клиническими проявлениями) и эндотипы (обусловленные механизмами формирования) реакций гиперчувствительности для персонализации терапии. Охарактеризованы два фенотипа – с немедленным (1–6 часов) и замедленным (более 6 часов) началом заболевания. Среди эндотипов рассматриваются 4 типа гиперчувствительности по Gell и Coombs с наличием первичной сенсибилизации. Помимо этого, выделяют взаимодействие лекарств с иммунными рецепторами на лимфоцитах, согласно фармаколого-иммунной концепции Pichler, и влияние лекарственных средств напрямую на рецепторы эффекторных клеток и сигнальные каскады без первичной сенсибилизации и очень быстро, что ранее классифицировалось как «псевдоаллергия». Для оптимизации терапии и предупреждения повторных реакций пациентам с лекарственной гиперчувствительностью необходима качественная диагностика с установлением причинно-значимого аллергена. В настоящее время она включает анамнестические данные, физикальный осмотр, тесты *in vivo* и *in vitro*. Провокационное тестирование из-за значительного риска выраженных побочных реакций применяется редко. Кожные тесты являются надежным и экономичным инструментом в том случае, если анамнез указывает на возможность IgE-зависимых реакций. Среди неспецифических методов лабораторной диагностики наибольшее клиническое значение показано для определения уровня триптазы в сыворотке крови, особенно при анафилактических реакциях. Среди специфических лабораторных методов, помимо генетического тестирования, используется измерение уровня специфических IgE к лекарствам, оценка активации и пролиферации лимфоцитов на антиген, а также тест активации базофилов, который обладает рядом преимуществ и позволяет выявить причинно-значимый аллерген для реакций гиперчувствительности, обусловленных различными механизмами. Поскольку ключевым фактором в развитии аллергического воспаления является нарушение процессов регуляции, то понимание механизмов нормализации нарушенной регуляторной функции иммунной системы откроет новые стратегии персонализированного

Адрес для переписки:

Бычкова Наталья Владимировна
ФГБУ «Всероссийский центр экстренной и радиационной
медицины имени А.М. Никифорова» МЧС России
198216, Россия, Санкт-Петербург,
Ленинский пр., 129, корп. 5, кв. 66.
Тел.: 8 (921) 320-12-62.
E-mail: BNV19692007@yandex.ru

Address for correspondence:

Bychkova Nataliya V.
A. Nikiforov Russian Centre of Emergency and Radiation
Medicine
198216, Russian Federation, St. Petersburg,
Leninsky ave., 129, bldg 5, apt 66.
Phone: 7 (921) 320-12-62.
E-mail: BNV19692007@yandex.ru

Образец цитирования:

Н.В. Бычкова «Лекарственная гиперчувствительность:
механизмы формирования и возможности
лабораторной диагностики» // Медицинская
иммунология, 2022. Т. 24, № 2. С. 235–246.
doi: 10.15789/1563-0625-DHM-2396
© Бычкова Н.В., 2022

For citation:

N.V. Bychkova “Drug hypersensitivity: Mechanisms and
opportunities of laboratory diagnostics”, *Medical Immunology
(Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2022, Vol. 24, no. 2,
pp. 235–246.
doi: 10.15789/1563-0625-DHM-2396
DOI: 10.15789/1563-0625-DHM-2396

лечения, направленные в том числе и на модулирование функций регуляторных клеток для достижения контроля над реакциями лекарственной гиперчувствительности.

Ключевые слова: реакции лекарственной гиперчувствительности, лабораторная диагностика гиперчувствительности

DRUG HYPERSENSITIVITY: MECHANISMS AND OPPORTUNITIES OF LABORATORY DIAGNOSTICS

Bychkova N.V.

*A. Nikiforov Russian Centre of Emergency and Radiation Medicine, St. Petersburg, Russian Federation
First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation*

Abstract. Permanently increased frequency of drug hypersensitivity is observed throughout the world and continues to be of concern to clinicians of either discipline. Diagnostic problems with prevention and treatment of hypersensitivity reactions are due to different pathogenetic mechanisms that may underly similar clinical manifestations. On the other hand, clinical symptoms, response to therapy and the outcome of the disease significantly depend on clinical state of the patient. The phenotypes which are determined by clinical manifestations, and endotypes dependent on the pathogenetic mechanisms of hypersensitivity reactions were specified to the purpose of personalized therapy. Two kinds of phenotypes are described: with immediate (1-6 hours) and delayed (more than 6 hours) onset of the response. Four types of hypersensitivity according to Gell and Coombs with the presence of primary sensitization are discerned between the endotypes. Moreover, interaction of drugs with immune receptors of lymphocytes, according to the Pichler's pharmaco-immune concept, has been identified, along with quick impact of drugs directly upon receptors of effector cells and signaling cascades without primary sensitization, which was previously termed as "pseudo-allergy". To optimize therapy and prevent repeated reactions in the patients with drug hypersensitivity, high-quality diagnostics with detection of the causal allergen is required. This strategy currently includes analysis of medical history, physical examination as well as *in vivo* and *in vitro* testing. Provocation tests are rarely used, due to the significant risk of severe adverse reactions. Skin tests are a reliable and cost-effective tool, if the case history infers possibility of IgE-dependent reactions. Among nonspecific laboratory markers, the greatest clinical value is shown for determining serum tryptase levels, especially in anaphylactic reactions. In addition to genetic testing, several specific laboratory methods are used, i.e., measuring levels of drug-specific IgE, assessment of antigen-induced activation and proliferation of lymphocytes as well as basophil activation test, which has a number of advantages and allows us to identify a causally significant allergen for the hypersensitivity reactions proceeding by various mechanisms. Due to dysregulation which is a key factor of allergic inflammation, the mechanisms of normalization for impaired immune regulation should be understood, thus offering new strategies for personalized treatment, e.c., modulating the regulatory cell functions, aiming for control of the drug hypersensitivity reactions.

Keywords: drug response, hypersensitivity, laboratory diagnostics

Введение

Нежелательные реакции на лекарственные средства подразделяют на ожидаемые, обусловленные фармакологическим действием (группа А, приблизительно 75%) и непредсказуемые, независимые от дозы (группа В, приблизительно 25%) [26], к которым относятся реакции лекарственной гиперчувствительности (РЛГ). Термин «лекарственная гиперчувствительность» шире, чем «лекарственная аллергия», и включает, помимо специфического иммунного ответа на комплекс лекарство(гаптен)-носитель [37] также непосредственные взаимодействия лекарственных средств с рецепторами на Т-лимфоцитах и/или тучных клетках и базофилах [52].

Согласно Международному Консенсусу по лекарственной аллергии 2014 года [24], реакции РЛГ встречаются более чем у 7% людей в популяции. Эпидемиологические данные о распространенности РЛГ в нашей стране и мире носят ограниченный характер в силу разных причин. В ряде случаев реакции на лекарственные средства не документируются в медицинских картах, несмотря на то, что такое указание является профилактикой повторной аллергической реакции, что отражено в федеральных клинических рекомендациях по диагностике и лечению лекарственной аллергии [3]. Часто РЛГ отмечаются со слов пациента, что не всегда носит доказательный характер.

Свойствами вызывать РЛГ обладают многие лекарственные средства, включая антибиотики,

противосудорожные средства, анестетики, нейромышечные блокаторы, химиотерапевтические препараты и нестероидные противовоспалительные средства (НПВС) [17]. Множественная лекарственная непереносимость возникает у 6% пациентов с тяжелыми реакциями на лекарственные средства [11].

Наибольшую угрозу для жизни несет анафилаксия — выраженная и очень быстрая реакция организма, в некоторых случаях приводящая к летальному исходу. По данным австралийских коллег, интраоперационная анафилаксия наиболее часто вызывается нейромышечными блокаторами и ассоциирована со смертностью от 3,5% до 10% [57]. Другие лекарственные препараты, вызывающие анафилаксию, — это главным образом антибиотики (чаще всего амоксициллин), НПВС, йодсодержащие рентгеноконтрастные препараты и вакцины [56].

Постоянный рост частоты встречаемости реакций гиперчувствительности на лекарственные препараты, как и аллергической сенсibilизации населения в целом [15], наблюдается во всем мире и вызывает тревогу у врачей всех специальностей. Отражением значительного внимания к данной проблеме служит тот факт, что в МКБ-11, которая рекомендована к использованию с 1 января 2022 г., будет подраздел Drug hypersensitivity «Лекарственная гиперчувствительность».

Персонализированная медицина в области алергологии/иммунологии

Персонализированная медицина — новый подход к профилактике и лечению заболеваний, который учитывает индивидуальный генетический профиль, фенотипические, биологические, физиологические особенности пациента.

Проблемы диагностики для профилактики и лечения реакций гиперчувствительности обусловлены тем, что, с одной стороны, схожие клинические проявления могут иметь в основе различные патогенетические механизмы, а с другой стороны, клинические симптомы, ответ на терапию и исход заболевания значительно зависят от особенностей состояния пациента. Наличие острых и хронических соматических и психических заболеваний человека, необходимая в связи с этим терапия, генотипическое и фенотипическое разнообразие в популяции, особенности образа жизни людей, включая питание, физическую активность, наличие вредных привычек — все это вносит вклад в интенсивность и длительность индивидуальной клинической симптоматики и должно приниматься во внимание при назначении специфической терапии.

Впервые в GINA-2014 прозвучало указание на то, что бронхиальная астма — гетерогенное заболевание. Разделение ее на фенотипы и эндотипы позволило достичь позитивных результатов при назначении, например, антицитокиновой биоло-

гической терапии [2], что привело к ее выраженной эффективности.

На основании достижений персонализированной медицины Европейская академия аллергии и клинической иммунологии ЕААСI совместно с Американской академией аллергии, астмы и иммунологии АААAI в 2017 году выработала концепцию о фенотипах и эндотипах аллергических реакций [45], что открыло возможности для персонализированной терапии, в том числе и пациентов с лекарственной гиперчувствительностью.

Фенотипы при реакциях лекарственной гиперчувствительности

Согласно концепции 2017 года [45], в случае реакций на лекарственные средства на основании схожих клинических характеристик предлагается выделить два фенотипа — с немедленным (1-6 часов) и замедленным (более 6 часов) началом заболевания.

При первом фенотипе наблюдаются кожные, респираторные, гастроинтестинальные симптомы, а также анафилактические реакции. Механизмы, вовлеченные в эти реакции, опосредуются не только иммуноглобулином класса E (IgE) и другими составляющими иммунных реакций, но включают прямое воздействие на тучные клетки и базофилы через рецепторы к анафилотоксинам C3a и C5a, рецептор MRGPRX2 (Mas-related G-protein-coupled receptor X2), а также ингибирование циклооксигеназы 1. В современной концепции лекарственной гиперчувствительности таким образом нет противопоставления иммунных (опосредованных иммунокомпетентными клетками и их продуктами) и неиммунных механизмов, в отличие от более ранних рекомендаций [34]. Взаимодополняемость различных механизмов гиперчувствительности способствует лучшему пониманию разнообразной клинической симптоматики. Понятие «псевдоаллергии», как описание неспецифических, не опосредованных рецепторами и менее серьезных реакций по сравнению с «настоящей» аллергией, видимо, остается в прошлом, хотя существует и альтернативное мнение [70].

Второе значительное отличие новой концепции от предыдущих, опирающихся исключительно на постулаты классификации Gell и Coombs 1968 года [20] — это допущение возможности развития IgE-зависимой реакции не только при повторном использовании лекарственного средства, но и при первом применении, что доказано для гиперчувствительности к таксанам у пациентов с онкопатологией, осложненной атопией [51].

Клинические проявления при втором фенотипе РЛГ предлагается разделить на реакции с изолированным поражением одного органа (например кожи) или системным поражением нескольких органов, включающим нарушения в

функционировании желудочно-кишечного тракта и гепатобилиарной системы, органов дыхания и кровообращения, мочеполовой и нервной систем, а также кроветворения [45]. В федеральных клинических рекомендациях по диагностике и лечению лекарственной аллергии [3] дан подробный перечень лекарственных средств, вызывающих те или иные повреждения органов. Предполагаемыми патогенетическими механизмами замедленных реакций могут быть участие специфических Т-клеток, а также молекулярная мимикрия между антигеном вируса, предварительно инфицировавшим организм, и лекарственным средством при текущем воздействии [67].

Эндоины при реакциях лекарственной гиперчувствительности

Согласно концепции 2017 года [45], выделяют несколько эндоинов реакций на лекарства, а именно, 4 типа по классификации Gell и Coombs [20], фармакологические взаимодействия согласно гипотезе Pichler [52], включая генетическую предрасположенность, а также непосредственную рецепторную активацию эффекторных клеток.

Как известно, 1-й тип по классификации Gell и Coombs — анафилактический с участием IgE, тучных клеток, базофилов с клиническими симптомами от крапивницы до анафилаксии. Постулировано образование эпитоп-специфического к лекарственному средству IgE в результате взаимодействия между лекарством, дендритной клеткой, Т-лимфоцитами 2-го типа иммунного ответа и плазматическими, синтезирующими IgE.

При 2-м типе — цитотоксическом — в повреждении тканей показано участие антител классов IgG и IgM, фиксированных на мембране клетки и вызывающих цитотоксические клеточные реакции, в которых задействованы моноциты и нейтрофилы. Примером может служить лекарственная гемолитическая анемия.

При 3-м типе — иммунокомплексном — постулировано участие антител классов IgG и IgM в составе свободно циркулирующих в крови иммунных комплексов. При этом повреждение тканей обусловлено, главным образом, присоединением к иммунному комплексу факторов системы complemento, например, при сывороточной болезни.

4-й тип — гиперчувствительность замедленного типа — опосредуется участием сенсибилизированных аллергеном лимфоцитов разных субпопуляций и характеризуется более длительным временем от воздействия аллергена до развития клинической симптоматики. По этому типу развиваются контактный дерматит и отсроченная макулопапулезная сыпь.

По 1-му типу протекают реакции на пенициллины, цефалоспорины, НПВС и др., по 2-3-му типу — на многие антибиотики, сыворотки, вакцины, анестетики и др., 4-й тип характерен для реакций на сульфаниламидные антибиоти-

ки, местные анестетики, металлы и их соединения [3].

Согласно постулатам Gell и Coombs [20], лекарства являются гаптенами, имеют способность ковалентно соединяться со свободными белками плазмы (особенно модифицированными в результате воспалительной реакции в организме) или мембрано-ассоциированными белками с образованием нового антигена (аллергена). Они проходят процессинг, презентуются антигенпредставляющими клетками вместе с нерестриктированными молекулами HLA (Human Leucocyte Antigen) человека Т- и В-лимфоцитам для запуска иммунного ответа. Авторами постулировано, что первое взаимодействие вызывает только сенсибилизацию, а при повторном происходит эффекторная фаза реакции с клиническими проявлениями.

Поскольку не все особенности иммунного ответа можно было объяснить с точки зрения классификации Gell и Coombs, в 2006 году W.J. Pichler была предложена фармаколого-иммунная концепция (p-i) [52], в которой главными действующими участниками были Т-лимфоциты. При этом постулировано, что лекарства не будут проявлять себя как гаптены. Препараты будут нековалентно с помощью слабых водородных, электростатических связей, Ван-дер-Ваальсовых взаимодействий соединяться с иммунными рецепторами — рестриктированными молекулами HLA и/или Т-клеточными рецепторами (TCR) без образования нового антигена (аллергена). Эффекторная фаза наступает очень быстро, потому что нет процессинга и презентации антигена для запуска иммунного ответа, а происходит прямая активация Т-клеток, секреция цитокинов, усиление пролиферации. Последствия зависят от локализации сайта связывания на молекуле-мишени, силы связи, предсуществующей активации Т-лимфоцитов (чем выше активация клеток, тем ниже порог, требующийся для запуска реакции гиперчувствительности), что укладывается в гетерогенность иммунного ответа с точки зрения персонализированного подхода в медицине.

Примером p-i-взаимодействия лекарственного препарата и Т-клеточного рецептора является реакция на сульфаметоксазол, вызывающая специфический Т-клеточный ответ, который приводит к различным путям активации Т-клеток [65].

Некоторые из фармаколого-иммунных взаимодействий происходят только у носителей определенных аллелей генов главного комплекса гистосовместимости человека и могут привести к клинически тяжелым реакциям. Показаны возможности взаимодействия противовирусного препарата абакавир с F-карманом HLA B*57:01 [47], который встречается у 5% европейского населения, карбамазепина — с HLA B*15:02 у азиатских народов с развитием синдро-

ма Стивенса—Джонсона и токсического эпидермального некролиза [19], а также аллопуринола с HLA B*5801 [69] с разнообразной клинической симптоматикой.

Следующий эндотип — влияние лекарств напрямую на эффекторные клетки и сигнальные каскады без первичной сенсibilизации и очень быстро, что ранее классифицировалось как «псевдоаллергия».

Показано, что препараты, вызывающие выраженный синтез анафилотоксинов C3a и C5a через свои рецепторы вызывают дегрануляцию тучных клеток и базофилов, например, это показано для таксанов наряду с IgE-опосредованными реакциями [63].

В экспериментальных исследованиях доказано, что опиаты, в частности кодеин, вызывают дегрануляцию и хемокиновую продукцию тучных клеток человека через активацию протеинкиназы A и фосфоинозитол-3 киназы [60].

НПВС блокируют циклооксигеназную активность, увеличивают синтез лейкотриенов, что клинически манифестирует бронхоспазмом, астмой, крапивницей [18].

Многие лекарства с катионными группами, содержащие мотивы TНIQ, такие как нейропептиды, β-дефенсин-3, антагонист В2 рецептора брадикинина икатибант, а также хинолоны (ципрофлоксацин и левофлоксацин), нейромышечные блокаторы через рецептор MRGPRX2 стимулируют высвобождение гистамина из активированных тучных клеток и базофилов, вызывая крапивницу и анафилаксию [44, 66].

Обследование пациентов с подозрением на лекарственную гиперчувствительность

Для оптимизации терапии и предупреждения повторных реакций пациентам с лекарственной гиперчувствительностью необходима качественная диагностика. В настоящий момент постулировано, что основанием для постановки диагноза лекарственной гиперчувствительности являются данные анамнеза и физикальное обследование, в дополнение к которым возможно использование провокационных тестов *in vivo*, теста торможения естественной эмиграции лейкоцитов (ТТЕЭЛ) по А.Д. Адо, кожного тестирования, а также лабораторных методов исследования [3, 15].

Несмотря на то, что провокационное тестирование является «золотым стандартом» подтверждения сенсibilизации, из-за значительного риска выраженных побочных реакций оно применяется редко [4].

Кожные тесты являются надежным и экономичным инструментом в том случае, если анамнез указывает на возможность IgE-зависимых реакций [5, 15]. Для идентификации РЛГ обычно используют внутрикожное тестирование. Существует множество ограничений для данного вида подтверждения сенсibilизации — выраженная острота и тяжесть клинических проявлений,

прием глюкокортикостероидов, кромонов, антигистаминных препаратов, антидепрессантов, повреждение кожных покровов и др. [1]. При высокой специфичности — до 95%, показанной, например, для реакций на тиопентал, пропофол, кетамин, чувствительность выявления сенсibilизации невелика [14], вероятно, в связи с множеством патогенетических механизмов лекарственной гиперчувствительности, среди которых IgE-опосредованный не является доминирующим. Утвержденный протокол кожного тестирования в настоящее время доступен только для пенициллина и бета-лактамов [15].

Патч-тестирование с нанесением лекарственных аллергенов на кожу может быть использовано для выявления лекарств, вызывающих контактный дерматит и другие реакции IV типа, при этом отрицательный результат не исключает наличия сенсibilизации [7].

Лабораторные методы диагностики сенсibilизации к лекарственным препаратам

Предложены различные лабораторные тесты для подтверждения клинически выраженных РЛГ и предсказания отсутствия реакций на препараты до их применения, что имеет высокое клиническое значение.

Среди лабораторных методов подтверждения сенсibilизации выделяют неспецифические и специфические тесты. Оценка диаминооксидазы, проведение прямой и непрямой пробы Кумбса, подсчет циркулирующих иммунных комплексов и определение компонентов комплемента, хотя и обсуждаются в литературе [15], но ввиду отсутствия стандартизации в широкую клиническую практику не вошли.

Среди неспецифических методов наибольшее клиническое значение показано для определения уровня триптазы в периферической крови. Повышенные уровни триптазы в сыворотке указывают на активацию тучных клеток и базофилов как через IgE-зависимые, так и IgE-неопосредованные механизмы. Показано для пациентов с тяжелыми реакциями гиперчувствительности при проведении общей анестезии [9], что в первом случае уровень триптазы приблизительно в 2 раза выше (9 и 4 мкг/л). Выявлена связь уровня триптазы с тяжестью анафилактической реакции, в том числе гипотензии, но при этом подчеркивается, что у значительного количества пациентов с анафилаксией (не менее 36% в данном исследовании) уровень триптазы в остром периоде оставался невысоким [58], что значительно снижает чувствительность метода. Диагностика анафилактических реакций с использованием триптазы основана на двойной оценке ее уровня — на фоне остроты РЛГ в течение 15 минут — 3 часов после реакции и при ее разрешении для сравнения с базовым уровнем [15]. Измерение уровня триптазы может быть наиболее полезно в случаях, когда клинические признаки активации тучных клеток

и базофилов стерты в результате премедикации антигистаминными препаратами или глюкокортикостероидами.

Среди специфических методов лабораторной диагностики, помимо генетического тестирования, следует рассмотреть измерение уровня специфических IgE к лекарствам, методы, оценивающие активацию Т-лимфоцитов, а также тест активации базофилов.

Для оценки генетической предрасположенности к РЛГ на абакавир необходимо исключить у пациента наличие HLA B*57:01, на карбамазепин — HLA B*15:02, на аллопуринол — HLA B*58:01, что обсуждалось выше. Генетическое тестирование также важно для проблемы множественной лекарственной непереносимости, т.к. показана возможность РЛГ в результате связывания ламотриджина и фенитоина с белком, кодирующимся тем же аллелем HLA B*15:02, у пациентов с реакцией на карбамазепин [33].

Анализ специфических IgE к пищевым, пыльцевым, эпидермальным аллергенам является самым часто используемым и полезным тестом *in vitro*, но для оценки сенсibilизации к лекарственным препаратам его чувствительность невелика [5] и даже при использовании эталонной технологии ImmunoCAP вариabельна в зависимости от препарата [42]. В обзоре С. Mayorга и соавт. [42] на основании анализа 185 литературных источников приводятся следующие данные — чувствительность определения сенсibilизации к бета лактамам 0-50%, к рокуронию 83-92%, к морфину 78-84%, к суксаметонию 44%. В недавно опубликованной работе корейских исследователей [50] продемонстрированы 100%-ные специфичность и чувствительность самостоятельно изготовленной на платформе ImmunoCAP тест-системы для подтверждения анафилаксии к цетуксимабу. У всех 4 пациентов с анафилаксией были положительные кожные пробы, уровень IgE к искомому препарату был более 0,35кЕА/л. Вероятно, этот высокопозитивный результат обусловлен значительным перекрестным сходством цетуксимаба с Alpha-gal молекулой (ImmunoCAP код o215, бычий тиреоглобулин) и аллергеном Beef (ImmunoCAP код f27, красное мясо), для которых у данной когорты пациентов получены идентичные положительные результаты sIgE. По мнению экспертов, опубликовавших в 2020 году практическое руководство по оценке и лечению лекарственной гиперчувствительности [15], коммерческие тесты, измеряющие специфические IgE к лекарствам, редко играют решающую роль в оценке и ведении пациентов. Помимо небольшого количества доступных реагентов главным ограничением данного метода диагностики является тот факт, что лекарственная аллергия не всегда IgE-опосредована. Как было рассмотрено выше, указывается на множество других механизмов возникновения РЛГ.

Для освещения полноты картины следует упомянуть методы, оценивающие пролиферативную либо секреторную активность Т-лимфоцитов, участие которых в некоторых РЛГ несомненно. После инкубации с испытуемым препаратом возможно оценить увеличение пролиферации аллерген-специфичных лимфоцитов на основе анализа клеток в разных фазах клеточного цикла по инкорпорации тимидина или с использованием красителей ДНК методом проточной цитометрии. Данный тест полностью не стандартизован, его рекомендуют проводить в экспертных лабораториях, потому что результат значительно зависит от условий проведения теста, наличия специфического оборудования и квалификации персонала. Например, было показано, что для достижения лучших результатов пролиферативный тест у пациентов с макуло-папулезной экзантемой и синдромом Стивенса—Джонсона необходимо проводить в острой фазе реакции, а при DRESS-синдроме на стадии восстановления [35]. При аллергии на бета-лактамы чувствительность теста трансформации лимфоцитов была 62% [39].

В исследовании Daubner В. и соавт. [22] у всех 7 обследованных пациентов с множественной лекарственной непереносимостью через несколько лет после развития клинических симптомов РЛГ в пролиферативном тесте были выявлены специфичные к препаратам Т-лимфоциты, находящиеся во фракции активированных клеток CD3⁺CD38⁺PD1⁺. Длительная годами активация аллерген-специфичных лимфоцитов снижает порог для возникновения новых реакций лекарственной гиперчувствительности и приводит к множественной лекарственной непереносимости.

Рекомендовано исследовать пролиферативный потенциал клеток через 6-7 суток [53]. Для сокращения времени проведения теста вместо оценки пролиферации аллерген-сенсibilизированных лимфоцитов возможно определение экспрессии на клетках активационных маркеров CD69, CD25, HLA DR, CD71 на 2-е сутки после взаимодействия *in vitro* лекарственного препарата и лимфоцитов крови [8]. Показана хорошая сходимость результатов обоих методов [54].

Для оценки секреторного потенциала лимфоцитов периферической крови после инкубации с причинно-значимым аллергеном предложено определение в супернатантах клеточных культур различных цитокинов (интерферон γ , интерлейкины 2, 5, 13) [38], но клиническая эффективность данного метода неясна.

В заключении обзора лабораторных методов оценки сенсibilизации пациентов к лекарственным средствам необходимо более подробно рассмотреть клиническую эффективность относительно нового теста активации базофилов (БАТ). Он является функциональным и основан на детекции активированных аллергеном *in vitro*

базофильных гранулоцитов [1, 29, 30]. Этот тест сочетает в себе как безопасность для пациента, поскольку лабораторная оценка проводится вне организма, так и преимущества провокационных проб для оценки взаимодействия возможного аллергена и клеток-эффекторов аллергического воспаления, но осуществляемые *in vitro*.

Базофилы являются аналогами тканевых тучных клеток, имеют схожий репертуар поверхностных рецепторов и внутриклеточных медиаторов аллергического воспаления [1]. Одним из преимуществ данного теста является то, что с его помощью можно выявить причинно-значимый аллерген независимо от механизма развития гиперчувствительности, потому что пути активации базофилов разнообразны. Главным механизмом, приводящим к дегрануляции клеток, служит перекрестное связывание аллергена с комплексом высокоаффинного рецептора к IgE и молекулы IgE на поверхности клетки. Существует возможность активации базофилов через связывание аллергена с комплексом IgG и рецептора FcγRIII, IgD с его рецептором, через рецепторы к компонентам комплемента (CD21/C3d, CD88/C5a) и Toll-like рецепторы [46], а также через рецептор MRGPRX2 [44, 66].

Во-вторых, в этом тесте можно выявлять сенсibilизацию практически к любому полному лекарственному препарату, а не только к основному действующему веществу, как это предлагается с использованием тест-систем для определения sIgE. Известно, что сенсibilизация возможна помимо основного действующего вещества и на другие составляющие, входящие в готовое лекарственное средство [43]. В отличие от кожных тестов, снижение чувствительности теста активации базофилов при приеме кромонов, антигистаминных препаратов, антидепрессантов не происходит. Состояние кожных покровов также не влияет на результаты БАТ. Относительным противопоказанием является прием глюкокортикостероидов.

Важное клиническое значение теста активации базофилов показано для диагностики реакций гиперчувствительности к бета-лактамам и не-беталактамам антибиотикам [28, 64], йодсодержащим рентгеноконтрастным веществам [50], ингибиторам протонной помпы [36], противопаразитарным препаратам [10], суггаммедексу [31], триметоприму [55], ортофталевому альдегиду [62], противоопухолевым препаратам [48] и др.

Специфичность БАТ для большинства лекарственных препаратов составляет 90-100%, чувствительность ниже и сильно различается в зависимости от лекарственного средства. Для выявления РЛГ на метронидазол чувствительность БАТ составила 71,4%, на орнидазол 83,3%, при этом показатель для кожных проб составил 33,3% и 16,6% соответственно [10]. 75% пациентов с

клиническими проявлениями РЛГ на различные антибиотики имели положительный результат в БАТ, при этом у всех 5 пациентов с тяжелой анафилаксией была подтверждена реакция в БАТ, а кожные тесты были положительны только у 3 человек [64]. Чувствительность подтверждения анафилаксии на суггаммедекс в БАТ составила 88% [31]. В работе Laguna и соавт. [36] указывается на схожую чувствительность выявления сенсibilизации к омепразолу для БАТ (73,8%) и кожных тестов (66,7%), но при этом тест активации базофилов был положительным у 57% пациентов с негативными кожными пробами. Чувствительность выявления РЛГ при комбинации обоих методов составила 86%. При оценке сенсibilизации к нейромускулярным блокаторам БАТ не показал лучшей специфичности по сравнению с кожным тестированием [25], но большинство других авторов приходят к мнению, что использование теста активации базофилов *in vitro* полезно и может значительно сократить необходимость проведения провокационного тестирования, которое несет опасность для пациентов с клинически выраженными реакциями на разнообразные лекарственные средства [28, 40, 62].

Особая роль теста активации базофилов показана для диагностики сенсibilизации у пациентов с тяжелыми реакциями, которым невозможно применить кожное и провокационное тестирование, а также в том случае, если механизм лекарственной гиперчувствительности не опосредован IgE [16].

Иммунная регуляция при лекарственной гиперчувствительности

Несмотря на то, что некоторые механизмы взаимодействия лекарственных средств и живых организмов уже имеют доказательную базу, продолжается изучение как следующих возможных мишеней такого взаимодействия, так и регуляции иммунного ответа в целом. Для понимания патогенеза аллергических реакций важно, с одной стороны, знание иммунных и неиммунных механизмов, каким образом лекарство вызывает повреждение тканей, а с другой стороны, как иммунная система самостоятельно либо при помощи терапевтических воздействий стремится ограничить гиперактивацию аллергического воспаления.

Многими исследователями признается ключевым фактором в развитии аллергического воспаления нарушение регуляции — одной из основополагающих функций иммунной системы [2].

Выявление в последние годы регуляторных клеток среди всех популяций лимфоцитов (Т-, В- и NK-клетки) подтверждает сложный и многообразный характер иммунных взаимодействий при различной, в том числе аллергической патологии.

Постулировано [12], что Т-регуляторные клетки способны ингибировать иммунный ответ 2-го типа, характерный для аллергических заболе-

ваний. Они негативно влияют на Т-лимфоциты 2-го типа, врожденные лимфоидные клетки 2-го типа, В-лимфоциты, синтезирующие IgE, при этом индуцируя толерогенные дендритные клетки, регуляторные В-клетки и В-лимфоциты, синтезирующие IgG4. Показано [32], например, что дисбаланс эффекторных и регуляторных лимфоцитов вносит вклад в патогенез воспаления при астме и аллергическом рините у детей. Но, например, у пациентов с РЛГ, в том числе с множественной лекарственной непереносимостью, Daubner В. и соавт. [22] не выявил функциональной недостаточности общего пула Т-регуляторных клеток CD4⁺CD25^{bright}FoxP3⁺, что, возможно, связано именно с оценкой всей популяции Т-регуляторных лимфоцитов в целом.

Описаны [12, 68] как минимум 7 подмножеств регуляторных клеток только среди Т-лимфоцитов – естественные (nTreg), индуцибельные (iTreg), индуцибельные костимулирующие (ICOS⁺ Tregs), Tr1, CD8⁺ Treg, продуцирующие интерлейкин 17 Treg и фолликулярные регуляторные Т-хелперы. Предполагают, что отдельные популяции могут участвовать в сдерживании аллергического воспаления.

Нарушенное соотношение фолликулярных эффекторных Т-хелперов и фолликулярных регуляторных Т-хелперов, вызванное избыточной активацией первых и дефицитом вторых, может представлять собой общий признак аллергических заболеваний [68].

Активно исследуется роль регуляторных клеток в процессе десенсибилизации организма в результате аллергенспецифической иммунотерапии (АСИТ) [49]. АСИТ является единственной патогенетически обоснованной терапией при большинстве аллергических заболеваний, обеспечивающей длительный положительный эффект. Несмотря на то, что нет полного понимания механизмов АСИТ, показано, что регуляторные клетки вносят вклад в ее эффективность. Например, у пациентов с поллинозом при подкожном проведении АСИТ выявлено повышение Tr1-регуляторных и В-регуляторных клеток по сравнению с пациентами без терапии [41]. Аналогично АСИТ, существует практика достижения толерантности к лекарствам с помощью процедуры десенсибилизации, которая способна вызвать временное гипоактивное состояние путем введения необходимого препарата от субоптимальных концентраций до требуемой дозировки [23]. Увеличение Т-регуляторных клеток в периферической крови описано у пациента с нефротическим синдромом на фоне успешной процедуры десенсибилизации к ритуксимабу [6].

Роль регуляторных клеток заключается в синтезе иммунорегуляторных и иммуносупрессорных цитокинов, а именно трансформирующего

ростового фактора β , интерлейкинов 10, 27, 35, 37 [13]. Эти цитокины ограничивают избыточное воспаление и предотвращают повреждение тканей, тем самым сглаживая тяжесть клинических проявлений.

Возможно, при нарушении регуляции воспалительной реакции латентная сенсibilизация манифестирует клиническими проявлениями аллергической реакции. Продолжается поиск новых терапевтических воздействий, направленных на коррекцию избыточного воспаления, помимо использования глюкокортикостероидных препаратов и других лекарств с иммуносупрессивными свойствами.

Существуют экспериментальные и клинические данные о позитивном влиянии на аллергическое воспаление низкоуровневой лазерной терапии. Например, в работе Silva V.R. и соавт. [61] в результате облучения кожи мышей с аллергической астмой наблюдали снижение гиперреактивности бронхов, уменьшение эозинофилов и эотоксина в легких, цитокинов 2-го типа иммунного ответа через изменение экспрессии в легочной ткани фактора STAT-6. Дополнительно было показано противовоспалительное действие лазерной терапии при индукции аллергического воспаления окислительным стрессом [21]. В бронхоальвеолярном лаваже мышей после облучения снижались уровни хемокинов, RANTES, CCL3, CCL8, эотоксина и нормализовались уровни антиоксидантов. При проведении лазерной акупунктуры у пациентов с бронхиальной астмой наблюдали значительное улучшение клинических симптомов согласно контрольному опроснику и снижение в конденсате выдыхаемого воздуха маркера окислительного стресса 8-изопростана [27]. Возможно, в будущем лазерную терапию можно будет использовать и для купирования аллергического воспаления у пациентов с лекарственной гиперчувствительностью.

Заключение

На протяжении последних лет происходят позитивные изменения в понимании механизмов лекарственной гиперчувствительности. Выделение фенотипов и эндотипов РЛГ, несомненно, будет полезно для определения тактики ведения пациентов, что приведет к персонифицированной эффективной терапии.

В настоящий момент тактика ведения пациентов включает немедленную отмену предполагаемого причинно-значимого лекарственного средства и перекрестно-реагирующих лекарств. В зависимости от клинических проявлений аллергической реакции назначается лечение. В условиях стационара возможно проведение десенсибилизации врачом – аллергологом-иммунологом [3]. Дополнительно необходимо купировать очаги хронической инфекции для снижения

общего воспалительного характера иммунного ответа.

Для определения причинно-значимого лекарственного средства помимо анамнестических данных, физикального осмотра и тестов *in vivo* должны применяться наиболее чувствительные и специфичные методы лабораторной диагностики. Одним из лучших в настоящее время признан тест активации базофилов *in vitro*.

Понимание механизмов нормализации нарушенной регуляторной функции иммунной системы и возникновения толерантности при участии регуляторных лимфоцитов в процессе десенсибилизирующей терапии откроет новые стратегии лечения, направленные в том числе и на модулирование функций регуляторных клеток для достижения контроля над реакциями лекарственной гиперчувствительности.

Список литературы / References

1. Бычкова Н.В. Активация базофилов: теоретические аспекты и применение в диагностике аллергических заболеваний // Медицинская иммунология, 2021. Т. 23, № 3. С. 481-494. [Bychkova N.V. Basophil activation: theoretical aspects and use in the diagnosis of allergic diseases. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2021, Vol. 23, no. 3, pp. 481-494. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-BAT-2174.
2. Симбирцев А.С. Цитокины в иммунопатогенезе аллергии // Российский медицинский журнал «Медицинское обозрение», 2021. № 1. С. 32-37. [Simbirtsev A.S. Cytokines and their role in immune pathogenesis of allergy. *Rossiyskiy meditsinskiy zhurnal "Meditsinskoe obozrenie" = Russian Medical Inquiry*, 2021, Vol. 5, no. 1, pp. 32-37. (In Russ.)]
3. Федеральные клинические рекомендации по диагностике и лечению лекарственной аллергии // Клинические рекомендации. Аллергология и клиническая иммунология / Под ред. Хаитова Р.М., Ильиной Н.И. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2019. С. 190-213. [Federal clinical guidelines for the diagnosis and treatment of drug allergy. Clinical guidelines. Allergology and clinical immunology. Ed. Khaitov R.M., Ilyina N.I.] Moscow: GEOTAR-Media, 2019, pp. 190-213.
4. Aberer W., Bircher A., Romano A., Blanca M., Campi P., Fernandez J., Brockow K., Pichler W.J., Demoly P.; European Network for Drug Allergy (ENDA); EAACI interest group on drug hypersensitivity. Drug provocation testing in the diagnosis of drug hypersensitivity reactions: general considerations. *Allergy*, 2003, Vol. 58, no. 9, pp. 854-863.
5. Ansotegui I.J., Melioli G., Canonica G.W., Caraballo L., Villa E., Ebisawa M., Passalacqua G., Savi E., Ebo D., Gómez R.M., Luengo Sánchez O., Oppenheimer J.J., Jensen-Jarolim E., Fischer D.A., Haahtela T., Antila M., Bousquet J.J., Cardona V., Chiang W.C., Demoly P.M., DuBuske L.M., Ferrer Puga M., Gerth van Wijk R., González Díaz S.N., Gonzalez-Estrada A., Jares E., Kalpaklioglu A.F., Kase Tanno L., Kowalski M.L., Ledford D.K., Monge Ortega O.P., Morais Almeida M., Pfaar O., Poulsen L.K., Pawankar R., Renz H.E., Romano A.G., Rosário Filho N.A., Rosenwasser L., Sánchez Borges M.A., Scala E., Senna G.E., Sisul J.C., Tang M.L.K., Thong B.Y., Valenta R., Wood R.A., Zuberbier T. IgE allergy diagnostics and other relevant tests in allergy, a World Allergy Organization position paper. *World Allergy Organ J.*, 2020, Vol. 13, no. 2, 100080. doi: 10.1016/j.waojou.2019.100080.
6. Aydogan M., Yologlu N., Gacar G., Uyan Z.S., Eser I., Karaoz E. Successful rapid rituximab desensitization in an adolescent patient with nephrotic syndrome: Increase in number of Treg cells after desensitization. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2013, Vol. 132, no. 2, pp. 478-480.
7. Barbaud A. Skin testing and patch testing in non-IgE-mediated drug allergy. *Curr. Allergy Asthma Rep.*, 2014, Vol. 14, no. 6, 442. doi: 10.1007/s11882-014-0442-8.
8. Beeler A., Pichler W.J. *In vitro* tests of T-cell-mediated drug hypersensitivity. Drug hypersensitivity. Basel, Karger, 2007, pp. 380-390.
9. Berroa F., Lafuente A., Javaloyes G., Ferrer M., Moncada R., Goikoetxea M.J., Urbain C.M., Sanz M.L., Gastaminza G. The usefulness of plasma histamine and different tryptase cut-off points in the diagnosis of perianaesthetic hypersensitivity reactions. *Clin. Exp. Allergy*, 2014, Vol. 44, no. 2, pp. 270-277.
10. Beyaz Ş., Akdeniz N., Yılmaz A., Demir S., Öztıp N., Çolakoğlu B., Büyüköztürk S., Deniz G., Gelincik A. Diagnostic workup including CD203c-based basophil activation test in immediate hypersensitivity due to metronidazole and ornidazole and evaluation of cross-reactivity in between. *Allergy*, 2021, Vol. 76, no. 3, pp. 842-852.
11. Blumenthal K.G., Li Y., Acker W.W., Chang Y., Banerji A., Ghaznavi S., Camargo C.A. Jr., Zhou L. Multiple drug intolerance syndrome and multiple drug allergy syndrome: Epidemiology and associations with anxiety and depression. *Allergy*, 2018, Vol. 73, no. 10, pp. 2012-2023.
12. Boonpiyathad T., Sözüner Z.C., Akdis M., Akdis C.A. The role of Treg cell subsets in allergic disease. *Asian Pac. J. Allergy Immunol.*, 2020, Vol. 38, no. 3, pp. 139-149.
13. Branchett W., Lloyd C. Regulatory cytokine function in the respiratory tract. *Mucosal Immunol.*, 2019, Vol. 12, no. 3, pp. 589-600.
14. Brockow K., Garvey L.H., Aberer W., Atanaskovic-Markovic M., Barbaud A., Bilo M.B., Bircher A., Blanca M., Bonadonna B., Campi P., Castro E., Cernadas J.R., Chiriac A.M., Demoly P., Grosber M., Gooi J., Lombardo C., Mertes P.M., Mosbech H., Nasser S., Pagani M., Ring J., Romano A., Scherer K., Schnyder B., Testi S., Torres M., Trautmann A., Terreehorst I.; ENDA/EAACI Drug Allergy Interest Group. Skin test concentrations for systemically administered drugs – an ENDA/EAACI Drug Allergy Interest Group position paper. *Allergy*, 2013, Vol. 68, no. 6, pp. 702-712.
15. Broyles A.D., Banerji A., Castells M. Practical guidance for the evaluation and management of drug hypersensitivity: general concepts. *J. Allergy Clin. Immunol. Pract.*, 2020, Vol. 8, no. 9S, pp. S3-S15.

16. Campos L., Galvão V.R., Kalil J., Castells M., Giavina-Bianchi P. BAT in the diagnosis of drug allergy: a novel tool in clinical daily practice? *Curr. Allergy Asthma Rep.*, 2019, Vol. 19, no. 4, 20. doi: 10.1007/s11882-019-0852-8.
17. Chen C.B., Abe R., Pan R.Y., Wang C.W., Hung S.I., Tsai Y.G., Chung W.H. An updated review of the molecular mechanisms in drug hypersensitivity. *J. Immunol. Res.*, 2018, Vol. 2018, 6431694. doi: 10.1155/2018/6431694
18. Choi J.H., Kim M.A., Park H.S. An update on the pathogenesis of the upper airways in aspirin-exacerbated respiratory disease. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.*, 2014, Vol. 14, no. 1, pp. 1-6.
19. Chung W.H., Hung S.I., Hong H.S., Hsieh M.S., Yang L.C., Ho H.C., Wu J.Y., Chen Y.T. Medical genetics: a marker for Stevens-Johnson syndrome. *Nature*, 2004, Vol. 428, no. 6982, 486. doi: 10.1038/428486a.
20. Coombs P.R., Gell P.G. Classification of allergic reactions responsible for clinical hypersensitivity and disease. In: Gell, R.R., Ed., *Clinical Aspects of Immunology*, Oxford University Press, 1968, Oxford, pp. 575-596.
21. Costa Carvalho J.L., de Brito A.A., de Oliveira A.P., de Castro Faria Neto H.C., Pereira T.M., de Carvalho R.A., Anatriello E., Aimbire F. The chemokines secretion and the oxidative stress are targets of low-level laser therapy in allergic lung inflammation. *J. Biophotonics*, 2016, Vol. 9, no. 11-12, pp. 1208-1221.
22. Daubner B., Groux-Keller M., Hausmann O.V., Kawabata T., Naisbitt D.J., Park B.K., Wendland T., Lerch M., Pichler W.J. Multiple drug hypersensitivity: normal Treg cell function but enhanced *in vivo* activation of drug-specific T cells. *Allergy*, 2012, Vol. 67, no. 1, pp. 58-66.
23. de Las Vecillas Sánchez L., Alenazy L.A., Garcia-Neuer M., Castells M.C. Drug hypersensitivity and desensitizations: mechanisms and new approaches. *Int. J. Mol. Sci.*, 2017, Vol. 18, no. 6, 1316. doi: 10.3390/ijms18061316.
24. Demoly P., Adkinson N.F., Brockow K., Castells M., Chiriac A.M., Greenberger P.A., Khan D.A., Lang D.M., Park H.S., Pichler W., Sanchez-Borges M., Shiohara T., Thong B.Y. International Consensus on drug allergy. *Allergy*, 2014, Vol. 69, no. 4, pp. 420-437.
25. Dewachter P., Chollet-Martin S., Mouton-Faivre C., de Chaisemartin L., Nicaise-Roland P. Comparison of basophil activation test and skin testing performances in NMBA allergy. *J. Allergy Clin. Immunol. Pract.*, 2018, Vol. 6, no. 5, pp. 1681-1689.
26. Edwards I.R., Aronson J.K. Adverse drug reactions: definitions, diagnosis, and management. *Lancet*, 2000, Vol. 356, no. 9237, pp. 1255-1259.
27. Elsheikh M.S., Mohamed N.H., Alsharkawy A.A.A. Improvement of asthma control after laser acupuncture and its impact on exhaled 8-isoprostane as an oxidative biomarker in chronic bronchial asthma. *Respir. Med.*, 2019, Vol. 156, pp. 15-19.
28. Fernandez T.D., Mayorga C., Salas M., Barrionuevo E., Posadas T., Ariza A., Laguna J.J., Moreno E., Torres M.J., Doña I., Montañez M.I. Evolution of diagnostic approaches in betalactam hypersensitivity. *Expert Rev. Clin. Pharmacol.*, 2017, Vol. 10, no. 6, pp. 671-683.
29. Hemmings O., Kwok M., McKendry R., Santos A.F. Basophil activation test: old and new applications in allergy. *Curr. Allergy Asthma Rep.*, 2018, Vol. 18, no. 12, 77. doi: 10.1007/s11882-018-0831-5. Erratum in: *Curr. Allergy Asthma Rep.*, 2019, Vol. 19, no. 12, 58. doi: 10.1007/s11882-018-0831-5.
30. Hoffmann H.J., Santos A.F., Mayorga C., Nopp A., Eberlein B., Ferrer M., Rouzaire P., Ebo D.G., Sabato V., Sanz M.L., Pecaric-Petkovic T., Patil S.U., Hausmann O.V., Shreffler W.G., Korosec P., Knol E.F. The clinical utility of basophil activation testing in diagnosis and monitoring of allergic disease. *Allergy*, 2015, Vol. 70, no. 11, pp. 1393-1405.
31. Horiuchi T., Yokohama A., Orihara M., Tomita Y., Tomioka A., Yoshida N., Takahashi K., Saito S., Takazawa T. Usefulness of basophil activation tests for diagnosis of sugammadex-induced anaphylaxis. *Anesth. Analg.*, 2018, Vol. 126, no. 5, pp. 1509-1516.
32. Huang F., Yin J.N., Wang H.B., Liu S.Y., Li Y.N. Association of imbalance of effector T cells and regulatory cells with the severity of asthma and allergic rhinitis in children. *Allergy Asthma Proc.*, 2017, Vol. 38, no. 6, pp. 70-77.
33. Hung S.I., Chung W.H., Liu Z.S., Chen C.H., Hsieh M.S., Hui R.C., Chu C.Y., Chen Y.T. Common risk allele in aromatic antiepileptic-drug induced Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis in Han Chinese. *Pharmacogenomics*, 2010, Vol. 11, no. 3, pp. 349-356.
34. Johansson S.G., Hourihane J.O., Bousquet J., Brujnzeel-Koomen C., Dreborg S., Haahtela T., Kowalski M.L., Mygind N., Ring J., van Cauwenberge P., van Hage-Hamsten M., Wüthrich B. EAACI (the European Academy of Allergology and Clinical Immunology) nomenclature task force. A revised nomenclature for allergy. An EAACI position statement from the EAACI nomenclature task force. *Allergy*, 2001, Vol. 56, no. 9, pp. 813-824.
35. Kano Y., Hirahara K., Mitsuyama Y., Takahashi R., Shiohara T. Utility of the lymphocyte transformation test in the diagnosis of drug sensitivity: dependence on its timing and the type of drug eruption. *Allergy*, 2007, Vol. 62, no. 12, pp. 1439-1444.
36. Laguna J.J., Bogas G., Salas M., Mayorga C., Dionicio J., Gonzalez-Mendiola R., Ariza A., Fernández-Santamaría R., Olazabal I., Doña I., Fernandez T.D., Torres M.J. The basophil activation test can be of value for diagnosing immediate allergic reactions to omeprazole. *J. Allergy Clin. Immunol. Pract.*, 2018, Vol. 6, no. 5, pp. 1628-1636.e2.
37. Landsteiner K. Über heterogenetisches Hapten und Antigen. *Biochemische Zeitschrift*, Band, 1921, Vol. 119, pp. 294-306.
38. Lochmatter P., Beeler A., Kawabata T.T., Gerber B.O., Pichler W.J. Drug-specific *in vitro* release of IL-2, IL-5, IL-13 and IFN-gamma in patients with delayed-type drug hypersensitivity. *Allergy*, 2009, Vol. 64, no. 9, pp. 1269-1278.

39. Luque I., Leyva L., José Torres M., Rosal M., Mayorga C., Segura J.M., Blanca M., Juárez C. *In vitro* T-cell responses to beta-lactam drugs in immediate and nonimmediate allergic reactions. *Allergy*, 2001, Vol. 56, no. 7, pp. 611-618.
40. Marraccini P., Pignatti P., Alcama A.D.A., Salimbeni R., Consonni D. Basophil activation test application in drug hypersensitivity diagnosis: an empirical approach. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 2018, Vol. 177, no. 2, pp. 160-166.
41. Matsuda M., Terada T., Tsujimoto N., Morie Y., Ishida T., Takahashi H., Hamaguchi J., Tabuchi Y., Doi K., Noro K., Kikuoka Y., Omura S., Yoshida T., Ayani Y., Suzuki M., Ichihara T., Inaka Y., Inui T., Kawata R., Nabe T. Regulatory T and B cells in peripheral blood of subcutaneous immunotherapy-treated Japanese cedar pollinosis patients. *Immunotherapy*, 2019, Vol. 11, no. 6, pp. 473-482.
42. Mayorga C., Celik G., Rouzaire P., Whitaker P., Bonadonna P., Rodrigues-Cernadas J., Vultaggio A., Brockow K., Caubet J.C., Makowska J., Nakonechna A., Romano A., Montañez M.I., Laguna J.J., Zanoni G., Gueant J.L., Oude Elberink H., Fernandez J., Viel S., Demoly P., Torres M.J. *In vitro* tests for Drug Allergy Task Force of EAACI Drug Interest Group. *In vitro* tests for drug hypersensitivity reactions: an ENDA/EAACI Drug Allergy Interest Group position paper. *Allergy*, 2016, Vol. 71, no. 8, pp. 1103-1134.
43. Mayorga C., Sanz M.L., Gamboa P.M., García B.E., Caballero M.T., García J.M., Labrador M., Lahoz C., Longo Areso N., López Hoyos M., Martínez Quesada J., Monteseirín F.J.; Immunology Committee of the Spanish Society of Allergy and Clinical Immunology of the SEAIC. *In vitro* diagnosis of immediate allergic reactions to drugs: an update. *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.*, 2010, Vol. 20, no. 2, pp. 103-109.
44. McNeil B.D., Pundir P., Meeker S., Han L., Undem B.J., Kulka M., Dong X. Identification of a mast-cell-specific receptor crucial for pseudo-allergic drug reactions. *Nature*, 2015, Vol. 519, no. 7542, pp. 237-241.
45. Muraro A., Lemanske R.F. Jr., Castells M., Torres M.J., Khan D., Simon H.U., Bindslev-Jensen C., Burks W., Poulsen L.K., Sampson H.A., Worm M., Nadeau K.C. Precision medicine in allergic disease-food allergy, drug allergy, and anaphylaxis-PRACTALL document of the European Academy of Allergy and Clinical Immunology and the American Academy of Allergy, Asthma and Immunology. *Allergy*, 2017, Vol. 72, no. 7, pp. 1006-1021.
46. Nakashima C., Otsuka A., Kabashima K. Recent advancement in the mechanism of basophil activation. *J. Dermatol. Sci.*, 2018, Vol. 91, no. 1, pp. 3-8.
47. Norcross M.A., Luo S., Lu L., Boyne M.T., Gomarteli M., Rennels A.D., Woodcock J., Margulies D.H., McMurtrey C., Vernon S., Hildebrand W.H., Buchli R. Abacavir induces loading of novel self-peptides into HLA-B*57: 01: an autoimmune model for HLA-associated drug hypersensitivity. *AIDS*, 2012, Vol. 26, no. 11, pp. F21-29.
48. Ornelas C., Caiado J., Campos Melo A., Pereira Barbosa M., Castells M.C., Pereira Dos Santos M.C. The contribution of the basophil activation test to the diagnosis of hypersensitivity reactions to oxaliplatin. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 2018, Vol. 177, no. 3, pp. 274-280.
49. Palomares O., Akdis M., Martín-Fontecha M., Akdis C.A. Mechanisms of immune regulation in allergic diseases: the role of regulatory T and B cells. *Immunol. Rev.*, 2017, Vol. 278, no. 1, pp. 219-236.
50. Park K.H., Lee J., Beom S.H., Shin S.J., Ahn J.B., Kim S.R., Lee J.H., Park J.W. Nationwide pharmacovigilance data for cetuximab-induced anaphylaxis and predictive model validation using prospective specific IgE detection. *World Allergy Organ J.*, 2021, Vol. 14, no. 7, 100553. doi: 10.1016/j.waojou.2021.100553.
51. Picard M., Castells M.C. Re-visiting hypersensitivity reactions to taxanes: a comprehensive review. *Clin. Rev. Allergy Immunol.*, 2015, Vol. 49, no. 2, pp. 177-191.
52. Pichler W.J., Beeler A., Keller M., Lerch M., Posadas S., Schmid D., Spanou Z., Zawodniak A., Gerber B. Pharmacological interaction of drugs with immune receptors: the p-i concept. *Allergol. Int.*, 2006, Vol. 55, no. 1, pp. 17-25.
53. Pichler W.J., Srinoulprasert Y., Yun J., Hausmann O. Multiple drug hypersensitivity. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 2017, Vol. 172, no. 3, pp. 129-138.
54. Porebski G., Gschwend-Zawodniak A., Pichler W.J. *In vitro* diagnosis of T cell-mediated drug allergy. *Clin. Exp. Allergy*, 2011, Vol. 41, no. 4, pp. 461-470.
55. Pumar M., Varese N., Hew M., O'Hehir R.E., Zubrinich C. Trimethoprim anaphylaxis confirmed by a novel basophil activation test. *Ann. Allergy Asthma Immunol.*, 2021, Vol. 126, no. 6, pp. 722-723.
56. Renaudin J.M., Beaudouin E., Ponvert C., Demoly P., Moneret-Vautrin D.A. Severe drug-induced anaphylaxis: analysis of 333 cases recorded by the Allergy Vigilance Network from 2002 to 2010. *Allergy*, 2013, Vol. 68, no. 7, pp. 29-37.
57. Sadleir P.H., Clarke R.C., Bunning D.L., Platt P.R. Anaphylaxis to neuromuscular blocking drugs: incidence and cross-reactivity in Western Australia from 2002 to 2011. *Br. J. Anaesth.*, 2013, Vol. 110, no. 6, pp. 981-987.
58. Sala-Cunill A., Cardona V., Labrador-Horrillo M., Luengo O., Estes O., Garriga T., Vicario M., Guilarte M. Usefulness and limitations of sequential serum tryptase for the diagnosis of anaphylaxis in 102 patients. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 2013 Vol. 160, no. 2, pp. 192-199.
59. Salas M., Gomez F., Fernandez T.D., Doña I., Aranda A., Ariza A., Blanca-López N., Mayorga C., Blanca M., Torres M.J. Diagnosis of immediate hypersensitivity reactions to radiocontrast media. *Allergy*, 2013, Vol. 68, no. 9, pp. 1203-1206.
60. Sheen C.H., Schleimer R.P., Kulka M. Codeine induces human mast cell chemokine and cytokine production: involvement of G-protein activation. *Allergy*, 2007, Vol. 62, no. 5532-5538.
61. Silva V.R., Marcondes P., Silva M., Villaverde A.B., Castro-Faria-Neto H.C., Vieira R.P., Aimbire F., de Oliveira A.P. Low-level laser therapy inhibits bronchoconstriction, Th2 inflammation and airway remodeling in allergic asthma. *Respir. Physiol. Neurobiol.*, 2014, Vol. 194, pp. 37-48.

62. Sompornrattanaphan M., Kanistanon D., Srinoulprasert Y., Udnaen S., Jongjarearnprasert K., Wongsas C., Thongngarm T. Ortho-phthalaldehyde-induced anaphylaxis after cystoscopy: confirmation by the basophil activation test. *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.*, 2020, Vol. 30, no. 5, pp. 365-367.
63. Szebeni J., Alving C.R., Savay S., Barenholz Y., Prieve A., Danino D., Talmon Y. Formation of complement-activating particles in aqueous solutions of Taxol: possible role in hypersensitivity reactions. *Int. Immunopharmacol.*, 2001, Vol. 1, no. 4, pp. 721-735.
64. Thinnes A., Merk H.F., Wurpts G., Röseler S., Lehmann S., Tenbrock K., Baron J.M., Balakirski G. Individual risk assessment in the diagnosis of immediate type drug hypersensitivity reactions to betalactam and non-betalactam antibiotics using basophil activation test: a single center experience. *Cutan. Ocul. Toxicol.*, 2018, Vol. 37, no. 4, pp. 309-318.
65. Watkins S., Pichler W.J. Sulfamethoxazole induces a switch mechanism in T cell receptors containing TCRV β 20-1, altering pHLA recognition. *PLoS One*, 2013, Vol. 8, no. 10, e76211. doi: 10.1371/journal.pone.0076211.
66. Wedi B., Gehring M., Kapp A. The pseudoallergen receptor MRGPRX2 on peripheral blood basophils and eosinophils: Expression and function. *Allergy*, 2020, Vol. 75, no. 9, pp. 2229-2242.
67. White K.D., Chung W.H., Hung S.I., Mallal S., Phillips E.J. Evolving models of the immunopathogenesis of T cell-mediated drug allergy: The role of host, pathogens, and drug response. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2015, Vol. 136, no. 2, pp. 219-235.
68. Yao Y., Chen C.L., Yu D., Liu Z. Roles of follicular helper and regulatory T cells in allergic diseases and allergen immunotherapy. *Allergy*, 2021, Vol. 76, no. 2, pp. 456-470.
69. Yun J., Marcaida M.J., Eriksson K.K., Jamin H., Fontana S., Pichler W.J., Yerly D. Oxypurinol directly and immediately activates the drug-specific T cells via the preferential use of HLA-B*58:01. *J. Immunol.*, 2014, Vol. 192, no. 7, pp. 2984-2993.
70. Zhang B., Li Q., Shi C., Zhang X. Drug-induced pseudoallergy: a review of the causes and mechanisms. *Pharmacology*, 2018, Vol. 101, no. 1-2, pp. 104-110.

Автор:

Бычкова Н.В. — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории клинической иммунологии ФГБУ «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А.М. Никифорова» Министерства РФ по делам гражданской обороны, чрезвычайным ситуациям и ликвидации последствий стихийных бедствий; доцент кафедры иммунологии ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Author:

Bychkova N.V., PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Clinical Immunology, A. Nikiforov Russian Centre of Emergency and Radiation Medicine; Associate Professor, Department of Immunology, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Поступила 23.08.2021
Принята к печати 29.09.2021

Received 23.08.2021
Accepted 29.09.2021

МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ЛИМФОЦИТОВ В УСЛОВИЯХ СРЫВА ИММУННОЙ ТОЛЕРАНТНОСТИ У КРЫС

Скупневский С.В., Пухаева Е.Г., Бадтиев А.К., Руруа Ф.К.,
Батагова Ф.Э., Фарниева Ж.Г.

Институт биомедицинских исследований – филиал ФГБУН «Федерального научного центра
«Владикавказский научный центр Российской академии наук», г. Владикавказ, Республика Северная
Осетия – Алания, Россия

Резюме. Широкая распространенность аутоиммунных заболеваний, характеризующихся ранним дебютом и высокими рисками инвалидизации населения, определяет актуальность работы, цель которой заключалась в изучении метаболических особенностей лимфоцитов на фоне адьювант-индуцированной аутоиммунной патологии у крыс.

У крыс линии Wistar вызывали патологию субкутанным введением полного адьюванта Фрейнда, представляющего собой водно-масляную эмульсию, содержащую в качестве антигенов термически инактивированные микобактерии туберкулеза. Гематологические (общий анализ крови), биохимические (гидроперекиси, малоновый диальдегид (МДА), каталаза) и цитобиохимические изменения в лимфоцитах (лактатдегидрогеназа, сукцинатдегидрогеназа; ЛДГ, СДГ) наблюдали в динамике. Рентгенографию проводили по окончании эксперимента.

На начальной стадии (2 недели) формирования аутоиммунного артрита отмечается патологический лейкоцитоз ($26,12 \pm 2,30 \times 10^9/\text{л}$, что на 65% выше контроля, $p < 0,01$), тромбоцитоз ($675 \pm 30 \times 10^9/\text{л}$ на фоне контроля $536 \pm 27 \times 10^9/\text{л}$, $p < 0,01$) и развивается окислительный стресс (увеличение гидроперекисей на 7% и МДА на 32%, $p < 0,001$); энергетический статус лимфоцитов повышается за счет роста активности ЛДГ на 6,5% и СДГ на 49% относительно контроля. В хронической стадии (7 недель) на фоне снижения системного воспаления (общее количество лейкоцитов в опыте $19,59 \pm 1,40 \times 10^9/\text{л}$, в контроле $13,68 \pm 0,86 \times 10^9/\text{л}$, $p < 0,01$; правый сдвиг в лейкоцитарной формуле) сохраняется окислительный стресс (превышение МДА на 37% относительно контроля; активность каталазы снижается) и уменьшается активность ЛДГ (на 43%, $p < 0,01$) в лимфоцитах, что сопровождается их микроцитозом (коэффициент корреляции между радиусом лимфоцитов и активностью ЛДГ $r_{xy} = 0,87$). Наиболее характерные изменения затронули механизм энергетического обеспечения клеток: дыхательный коэффициент для контрольных животных (отношение ЛДГ/СДГ) варьирует в пределах 4,6–5,0, а на фоне формируемой патологии вклад процессов гликолиза существенным образом снижается до 3,2 ко 2-й неделе и 2,4 к 7-й неделе. На рентгенограмме к 7-й неделе у опытных животных отмечается неравномерное сужение суставных щелей, кистовидные образования и субхондральный склероз головок костей.

В условиях аутоиммунного ревматоидного артрита у крыс выявляются нарушения метаболического статуса лимфоцитов в виде общего энергетического дефицита и дисбаланса между процессами гликолиза и окислительного фосфорилирования, что позволяет глубже раскрыть патогенез и определяет направление поиска средств молекулярно-таргетной терапии и профилактики заболевания.

Ключевые слова: аутоиммунные заболевания, гликолиз, лимфоциты, метаболический статус лимфоцитов, окислительный стресс, оксигенная активность лимфоцитов, ревматоидный артрит

Адрес для переписки:

Пушаева Елена Георгиевна
Институт биомедицинских исследований
362025, Россия, Республика Северная Осетия – Алания,
г. Владикавказ, ул. Пушкинская, 47.
Тел.: 8 (928) 491-16-91.
E-mail: medgenetika435@yandex.ru

Address for correspondence:

Pukhaeva Elena G.
Institute of Biomedical Investigations
362025, Russian Federation, Republic of North Ossetia –
Alania, Vladikavkaz, Pushkinskaya str., 47.
Phone: 7 (928) 491-16-91.
E-mail: medgenetika435@yandex.ru

Образец цитирования:

С.В. Скупневский, Е.Г. Пушаева, А.К. Бадтиев,
Ф.К. Руруа, Ф.Э. Батагова, Ж.Г. Фарниева
«Метаболические изменения лимфоцитов в условиях
срыва иммунной толерантности у крыс» // *Медицинская иммунология*, 2022. Т. 24, № 2. С. 247-256.
doi: 10.15789/1563-0625-MCO-2408
© Скупневский С.В. и соавт., 2022

For citation:

S.V. Skupnevsky, E.G. Pukhaeva, A.K. Badtiev, F.K. Rurua,
F.E. Batagova, Z.G. Farnieva "Metabolic changes
of lymphocytes in a rat model of autoimmunity", *Medical
Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2022,
Vol. 24, no. 2, pp. 247-256.
doi: 10.15789/1563-0625-MCO-2408
DOI: 10.15789/1563-0625-MCO-2408

METABOLIC CHANGES OF LYMPHOCYTES IN A RAT MODEL OF AUTOIMMUNITY

Skupnevsky S.V., Pukhaeva E.G., Badtiev A.K., Rurua F.K.,
Batagova F.E., Farnieva Z.G.

Institute of Biomedical Investigations, Affiliation of Vladikavkaz Research Centre, Russian Academy of Sciences, Vladikavkaz, Republic of North Ossetia – Alania, Russian Federation

Abstract. Autoimmune diseases are highly prevalent in humans, being characterized by early onset and high risks of disability, thus determining the relevance of the present work and its aim, i.e., studying metabolic characteristics of lymphocytes upon the adjuvant-induced autoimmune disorder in rats.

Modeling of the autoimmune process was performed in Wistar rats by subcutaneous administration of a Freund's complete adjuvant, i.e., water-oil emulsion with heat-killed *M. tuberculosis*. Hematology testing (complete blood counts), biochemical markers (hydroperoxides, malondialdehyde (MDA), catalase), and cytobiochemical changes in lymphocytes (lactate dehydrogenase, succinate dehydrogenase; LDH, SDH) were followed in dynamics. X-ray examination was performed at the end of the experiment.

At the initial stage of autoimmune arthritis (2 weeks), leukocytosis was registered ($26.12 \pm 2.30 \times 10^9/L$, i.e., 65% over the controls, $p < 0.01$), thrombocytosis ($675 \pm 30 \times 10^9/L$, compared with $536 \pm 27 \times 10^9/L$ in controls, $p < 0.01$), and oxidative stress were also observed (hydroperoxides increased by 7%, and MDA, by 32%, $p < 0.001$); energy levels of the lymphocytes increased due to activation of LDH by 6.5%, and SDH, by 49% against the controls. At chronic stage of the disorder (7 weeks), the systemic inflammation was milder (total WBC counts of $19.6 \pm 1.40 \times 10^9/L$, compared with $13.68 \pm 0.86 \times 10^9/L$ in controls, $p < 0.01$, associated with shift to the right in differential counts), along with persisting oxidative stress (MDA exceeds the control levels by 37%; decrease in catalase activity), and lower LDH activity in lymphocytes (by 43%, $p < 0.01$) associated by their decrease in size (the correlation quotient between the lymphocyte radius and LDH activity is $r_{xy} = 0.87$).

Profound molecular changes were observed in the cell energy supply: the respiratory quotient for control animals (LDH/SDH ratio) varied within 4.6–5.0. Meanwhile, in autoimmune animals, metabolic contribution of glycolysis showed a significant decrease (the quotient of 3.2 by the 2nd week, and 2.4 by the 7th week). On the radiograph by 7th week, the experimental animals show uneven joint space narrowing, cyst-like formations and subchondral sclerosis of the bone heads.

Autoimmune rheumatoid arthritis in rats is characterized by metabolic disorders of lymphocytes manifesting as general energy deficiency, and imbalance between glycolysis and oxidative phosphorylation pathways. These findings allow of deeper insight into pathogenesis and suggesting further search for molecular targeted therapy and prevention of the disease.

Keywords: autoimmune diseases, glycolysis, lymphocytes, metabolic status, oxidative stress, oxygenase activity, rheumatoid arthritis

Введение

Аутоиммунные заболевания включают в себя более 100 нозологических форм и относятся к числу наиболее распространенных и тяжелых патологий, охватывающих 8% человеческой популяции [25]. Триггерами срыва иммунной толерантности являются генетическая предрасположенность и факторы внешней среды — в первую очередь инфекции [4, 27]. В работах [12, 16, 19] высказывается гипотеза о высокой вероятности возникновения и развития аутоиммунных расстройств в связи массовым распространением коронавирусной инфекции SARS-CoV-2, что может значительно увеличить первичную заболеваемость. О взаимосвязи вирусной инфекции и аутоиммунитета свидетельствует тот факт, что на фоне аутоиммунных патологий возрастает сте-

пень тяжести (в 1,21 раза) и смертности (в 1,31 раз) от COVID-19 [21].

Трудность в изучении генетических детерминант, управляющих механизмами иммунологической ауто толерантности, заключается в том, что только система HLA (Human Leukocyte Antigen) включает в себе более 9000 аллелей и относится к числу наиболее сложно устроенных структур организма [7]. Ряд авторов [10, 22] отмечает, что столь выраженный генный полиморфизм может быть обусловлен вспышками и эпидемиями инфекционных болезней известных в истории человечества, способствовавших наследственному закреплению аллелей с различной пептидсвязывающей способностью в реакциях с антигенами.

Не менее важную роль в реализации иммунных и аутоиммунных реакций играет метаболический

статус иммунокомпетентных клеток, в первую очередь — лимфоцитов [26]. В работе [8] отмечается, что активация лимфоцитов сопровождается резким нарастанием потребления и синтеза АТФ, который осуществляется преимущественно за счет процессов т.н. «аэробного гликолиза», обеспечивающего 100-кратный выигрыш в скорости наработки макроэргов по сравнению с процессом окислительного фосфорилирования, — доминирующего способа энергообеспечения в неактивированных клетках. Так, метаболическое перепрограммирование CD8⁺T-лимфоцитов с гликолиза на окислительное фосфорилирование является ключевым фактором, обеспечивающим систему долгоживущих клеток памяти [9, 18]; снижение энергетического потенциала влечет за собой апоптоз и истощение Т-субпопуляционного пула иммунных клеток [15, 28]. Реактивированные лимфоциты характеризуются высокой экспрессией транспортера глюкозы 1 (GLUT 1), что сопровождается увеличением продукции цитокинов и пролиферацией клеток [24]. В условиях ограничения нутриентов или метаболического ингибирования отмечается инактивация Т-лимфоцитов и неспособность их к пролиферации и дифференцировке [23]. В этой связи изучение процессов энергетического метаболизма лимфоцитов при аутоиммунных заболеваниях является актуальным, поскольку направлено на углубление знаний о патогенезе и способствует разработке эффективных таргетных мер лечения и профилактики.

Цель работы — изучении метаболических особенностей лимфоцитов на фоне адьювант-индуцированной аутоиммунной патологии у крыс.

Материалы и методы

Исследования проводили на самцах крыс линии Wistar с массой тела (м.т.) 400 ± 20 г (ФГУП «Питомник лабораторных животных "Рапполово"», Ленинградская область). Животные содержались в стандартных условиях вивария при постоянной температуре, влажности и световом режиме 12:12. Доступ к воде и пище — *ad libitum*. В работе с лабораторными животными придерживались правил и этических норм содержания и ухода, описанных в руководстве National Research Council, 2011 г. и ГОСТ Р 53434-2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики» с разрешения этического комитета при Институте биомедицинских исследований РАН. Животные были разделены на две группы — контрольную и опытную. Манипуляции по введению растворов проводились под легким общим наркозом («Золетил», Франция). Крысам контрольной группы ($n = 8$) вводили в правую заднюю конечность подкожно изотонический раствор хлорида

натрия в объеме 0,1 мл на 200 г м.т. Животным опытной группы ($n = 8$) вводили однократно в правую заднюю конечность полный адьювант Фрейнда Difco Laboratories (Detroit, Michigan, США) в объеме 0,1 мл на 200 г м.т. Забор крови осуществлялся под общим наркозом («Золетил») из сердца на 2-й и 7-й неделях. По окончании эксперимента (7 недель) осуществляли эвтаназию животных в CO₂-затравочной камере.

Гематологические параметры определяли на автоматическом гематологическом анализаторе Mythic 22 (Польша). Для повышения точности лейкоцитарную формулу рассчитывали с помощью «ручной» микроскопии мазка.

Активность ферментов в лимфоцитах определяли цитобиохимическим методом [2], предложенным Кондрашовой М.Н. и соавт. Для этого 10 мкл крови наносили на предметные стекла и с помощью прибора Microscopy Vision (Австрия) готовили мазки. Полученные препараты высушивали и фиксировали в 60% растворе ацетона в течение 30 с и ополаскивали дистиллированной водой. Активность СДГ определяли как разницу показателей (№1 — №2) интенсивности окраски гранул, полученных при инкубировании клеток крови в растворах следующего состава (рН $7,2 \pm 0,01$ при $t = 37^\circ\text{C}$): №1 — 125 ммоль/л KCl, 10 ммоль/л HEPES, 1 мг/мл нитросинего тетразолия окисленного (НСТ) и 5 ммоль/л янтарной кислоты; №2 — 125 ммоль/л KCl, 10 ммоль/л HEPES, 1 мг/мл НСТ и 5 ммоль/л малоновой кислоты, используемой в качестве селективного ингибитора СДГ. Активность ЛДГ определяли путем инкубации мазков крови в среде следующего состава (рН $7,2 \pm 0,01$ при $t = 37^\circ\text{C}$): 125 ммоль/л KCl, 10 ммоль/л HEPES, 1 мг/мл НСТ, 5 ммоль/л молочной кислоты, 5 ммоль/л малоновой кислоты, 0,5 ммоль/л НАДН. После инкубации (СДГ, ЛДГ) стекла промывали дистиллированной водой, высушивали и окрашивали в 0,05%-ном растворе нейтрального красного, имеющего сродство к ядрам клеток. Препараты микроскопировали при увеличении 10x100 под масляной иммерсией. На каждую крысу исследовалось по 100 клеток, которые для рандомизации отбирались из трех зон стекла: начальной, средней и финишной. Препараты фотографировали и обрабатывали в программе Bio Images (г. Пуццино), позволяющей рассчитывать линейные характеристики клеток и их компартментов, а также вычислять количество образуемого маркера дыхательной активности митохондрий — диформаза (у. е.).

Для биохимических исследований кровь центрифугировали и фракционировали. В плазме определяли содержание гидроперекисей по Гаврилову, используя наборы фирмы ООО «Агат-

Мед» (Россия), а в эритроцитах, отмытых холодным ($t = 4^{\circ}\text{C}$) изотоническим раствором, оценивали стандартным методом содержание малонового диальдегида (МДА) по реакции с тиобарбитуровой кислотой [3] и изучали активность каталазы по методике, основанной на спектрофотометрическом измерении кинетики распада перекиси водорода при длине волны 230 нм (Beutler T. [6]).

Рентгеновские снимки получали на стационарном ветеринарном аппарате Escoray Ultra 300V (Корея).

Рассчитывали среднее значение, стандартную ошибку среднего. Проверка нормальности распределения данных осуществлялась по критерию Шапиро–Уилка и при позитивном заключении сравнение гипотез проводилось по критерию Стьюдента в программе Microsoft Excel. Значимыми считались различия при $p \leq 0,05$. Корреляционные коэффициенты (r_{xy}) рассчитывались по Пирсону.

Результаты

Введение животным адьюванта Фрейнда, представляющего собой водно-масляную эмульсию термически инактивированных *M. tuber-*

culosis, сопровождалось индукцией каскада иммунных реакций организма, в том числе в отношении собственных клеток и тканей. Клиническим проявлением указанного спектра событий явился воспалительный процесс, характер и степень выраженности которого могут быть выявлены на основе результатов анализа крови (табл. 1–4).

Из таблицы 1 видно, что общее количество лейкоцитов у животных контрольной группы колеблется незначительно и находится в пределах физиологической нормы. На фоне антигенной стимуляции число клеток белой крови у опытных животных достоверно увеличивается к окончанию второй недели с момента индуцированной патологии на 65%. К седьмой неделе отмечается снижение интенсивности системного воспалительного процесса, о чем свидетельствует 25% уменьшение ($p < 0,05$) лейкоцитов в периферической крови. Достоверная динамика выявлена для палочкоядерных нейтрофилов у животных опытной группы: отмечено 2,5-кратное снижение их численности за период в пять недель (опыт 1 / опыт 2) и 3,5-кратное уменьшение относительно контрольной группы 1. Достоверное снижение общего количества сегментоядерных нейтрофи-

ТАБЛИЦА 1. ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ ЖИВОТНЫХ: БЕЛЫЙ РОСТОК

TABLE 1. HEMATOLOGICAL PARAMETERS OF ANIMALS: WHITE BLOOD CELLS

Изучаемый параметр Tested parameter	2 недели 2 weeks		7 недель 7 weeks	
	Контроль 1 Control 1	Опыт 1 Experience 1	Контроль 2 Control 2	Опыт 2 Experience 2
Лейкоциты, $10^9/\text{л}$ White blood cells, $10^9/\text{L}$	15,83±1,28	26,12±2,30**	13,68±0,86	19,59±1,40 ^{##} ^
П/я нейтрофилы, % Rod-shaped neutrophils, %	2,63±0,50	1,88±0,39	1,50±0,42	0,75±0,22^
С/я нейтрофилы, % Segmented neutrophils, %	20,13±0,44	25,25±1,29	23,50±2,89	17,89±1,84 ^{##}
Эозинофилы, % Eosinophils, %	3,38±0,82	4,13±1,33	3,38±0,65	3,13±0,44
Лимфоциты, % Lymphocytes, %	69,88±2,34	63,75±2,91	66,75±3,23	76,25±2,30 [#] ^^
Средний радиус лимфоцитов, мкм Mean radius of lymphocytes, μm	3,78±0,09	4,13±0,05**	3,83±0,07	3,57±0,08 [#] ^^^
Моноциты, % Monocytes, %	4,00±1,12	4,50±0,68	5,38±0,50	2,00±0,42 ^{###} ^^

Примечание. * – опыт 1 по отношению контролю 1; # – опыт 2 по отношению контролю 2; ^ – опыт 1 по отношению к опыту 2 (*, #, ^ – $p < 0,05$; **, ##, ^^ – $p < 0,01$; ***, ###, ^^^ – $p < 0,001$).

Note. *, experience 1 in relation to control 1; #, experience 2 in relation to control 2; ^, experience 1 in relation to experience 2 (*, #, ^, $p < 0.05$; **, ##, ^^, $p < 0.01$; ***, ###, ^^^, $p < 0.001$).

лов и моноцитов к окончанию эксперимента у животных опытной группы привело к изменениям в лейкоцитарной формуле и увеличению доли лимфоцитов на 14% (при сравнении с контрольной группой 2).

Радиус лимфоцитов, измеренный рандомизированно без разделения на субпопуляции, также отражает внутренние изменения в системе лимфопоэза: при снижении общей численности лимфоцитов (2-я неделя, опытная группа 1) он возрастает относительно контрольной группы 1 на 7% (достоверно), а на фоне относительного лимфоцитоза (7-я неделя, опыт 2) — наоборот, снижается на 9% (также достоверно). О качественных изменениях в исследуемой популяции клеток иммунной системы в процессе развития патологии свидетельствуют различия между двумя опытными группами в 16% ($p < 0,001$).

В системе эритрона значимых изменений под воздействием иммунотоксиканта не выявлено (табл. 2).

Количество клеток красной крови к окончанию эксперимента увеличивается в обеих группах, при этом во второй опытной — достоверно на 10% (опыт 1 / опыт 2). Как следствие — отмечается достоверное увеличение гемоглобина и гематокрита у животных, сами же эритроциты в сравниваемых группах и сериях значительно не различаются по своим морфологическим признакам и пигментному составу.

Изменения, затронувшие систему тромбоцитов под воздействием адьюванта Фрейнда, представлены в таблице 3.

Из таблицы 3 следует, что аутоиммунная патология сопровождается стойким увеличением тромбоцитов в крови — на 18-25% (относительно контроля, отличия достоверные). В качествен-

ТАБЛИЦА 2. ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ ЖИВОТНЫХ: КРАСНЫЙ РОСТОК

TABLE 2. HEMATOLOGICAL PARAMETERS OF ANIMALS: RED BLOOD CELLS

Исследуемый параметр Tested parameter	2 недели 2 weeks		7 недель 7 weeks	
	Контроль 1 Control 1	Опыт 1 Experience 1	Контроль 2 Control 2	Опыт 2 Experience 2
Эритроциты, $10^{12}/л$ Red blood cells, $10^{12}/L$	8,30±0,36	8,55±0,21	9,03±0,19	9,44±0,15 ^{^^}
Гемоглобин, г/л Hemoglobin, g/L	143,50±2,55	142,00±2,46	143,13±6,12	153,25±2,37 ^{^^}
Гематокрит, л/л Hematocrit, L/L	0,396±0,018	0,427±0,007	0,425±0,018	0,460±0,008 ^{^^}
Средний объем эритроцита, фл Mean corpuscular volume, fl	48,56±0,70	49,47±0,59	45,93±1,15	48,83±0,61
Среднее содержание гемоглобина в эритроците, пг Mean corpuscular hemoglobin, pg	16,18±0,23	16,43±0,16	15,71±0,44	16,30±0,16
Средняя концентрация гемоглобина в эритроците, г/л Mean corpuscular hemoglobin concentration, g/L	334,38±1,51	332,50±1,10	337,50±0,76	333,63±1,27 [#]
Ширина распределения эритроцитов по объему, % Red cell distribution width, %	15,53±0,09	15,91±0,39	16,23±0,56	15,74±0,26

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. As for Table 1.

ном отношении форменные элементы у опытных животных характеризуются микроцитозом — их объем снижается на 13-18% по сравнению с грызунами контрольной группы. Снижение среднего объема кровяных пластинок сопровождается также уменьшением коэффициента их анизотропии на 30-58% относительно группы сравнения.

Биохимические изменения, затрагивающие систему крови в условиях формируемой патологии, отражены в таблице 4.

Согласно представленным в таблице 4 результатам исследований, системные нарушения иммунитета проявляются патобиохимическими сдвигами в клетках крови. Прежде всего это проявляется активацией процессов перекисного окисления липидов: содержание первичных продуктов перекисной деструкции мембран (гидроперекисей) увеличивается на 7% (2-я неделя), а вторичных (МДА) — на 32-37% (2-я и 7-я недели соответственно). Компенсаторное повышение активности каталазы ко второй неделе на 10% не позволяет купировать наступление оксидативного стресса, а к 7-й неделе стрессорные нагрузки приводят к истощению резервов организма и спаду энзиматической активности хромопротеида относительно контрольных животных (опыт 2 и контроль 2 соответственно).

Активность ключевых ферментов, отвечающих за энергообеспечение лимфоцитов, в условиях патологии претерпевает значительные изменения: ЛДГ к окончанию второй недели увеличивается на 6,5%, а затем снижается на 43% относительно контроля; активность СДГ на протяжении всего периода наблюдений остается повышенной относительно контрольных животных на 49-51%.

Рентгенографически выявлено, что суставный аппарат животных опытной группы к окончанию 7-й недели эксперимента характеризуется неравномерным сужением суставных щелей, кистовидными просветлениями в головках костей и их субхондральным склерозом (рис. 1).

Костно-мышечный аппарат животных контрольной группы без видимых патологических изменений.

Обсуждение

Использование полного адьюванта Фрейнда в практике лабораторного моделирования широкого спектра аутоиммунных патологий: ревматоидного артрита, миокардита, увеита, энцефаломиелита и др. [11, 14, 17], обусловлено смещением баланса в сторону Th1-клонов, потенцирующих реакции гиперчувствительности замедленного типа в организме. Реализованная в данной работе схема введения полного адьюванта Фрейнда способствовала преимущественному формированию ревматоидного артрита, имеющего в основе патогенеза воздействие эпитопов микобактериального белка теплового шока *hsp65* на артритогенные клоны Т-лимфоцитов [13], провоцирующих острое околосуставное воспаление. Согласно полученным результатам, у животных опытной группы оказались сформированными клинические признаки нарушений в соединительной ткани — развитие склеротических изменений в головках костей.

В работе [20] отмечается, что адьювант-индуцированный ревматоидный артрит у крыс протекает в две фазы: первая (10-18 дни) — острое периартикулярное воспаление, синовит, отечность суставов; вторая (30 и более дни) — хроническое

ТАБЛИЦА 3. ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ ЖИВОТНЫХ: МЕГАКАРИОЦИТАРНЫЙ РОСТОК

TABLE 3. HEMATOLOGICAL PARAMETERS OF ANIMALS: MEGAKARYOCYTIC LINEAGE

Изучаемый параметр Tested parameter	2 недели 2 weeks		7 недель 7 weeks	
	Контроль 1 Control 1	Опыт 1 Experience 1	Контроль 2 Control 2	Опыт 2 Experience 2
Тромбоциты, 10 ⁹ /л Platelets, 10 ⁹ /L	536±27	675±30**	509±29	605±26 [#]
Средний объем тромбоцита, фл Mean platelet volume, fl	6,75±0,16	6,00±0,07**	7,16±0,36	6,06±0,05 ^{##}
Тромбокрит, % Plateletcrit, %	0,359±0,016	0,407±0,063	0,335±0,017	0,369±0,015
Относительная ширина распределения тромбоцитов по объему, % Platelet distribution width, %	19,29±2,22	14,84±0,77	25,60±3,52	16,15±0,90 [#]

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. As for Table 1.

ТАБЛИЦА 4. БИОХИМИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ КРОВИ

TABLE 4. BIOCHEMICAL PARAMETERS OF BLOOD

Изучаемый параметр Tested parameter	2 недели 2 weeks		7 недель 7 weeks	
	Контроль 1 Control 1	Опыт 1 Experience 1	Контроль 2 Control 2	Опыт 2 Experience 2
Гидроперекиси, мкмоль/л Hydroperoxides, mmol/L	4,84±0,13	5,20±0,19	5,73±0,59	4,68±0,13 [^]
МДА в эритроцитах, мкмоль/л Malondialdehyde in red blood cells, mmol/L	30,17±0,85	48,18±1,66***	26,40±1,88	44,20±1,10###
Каталаза в эритроцитах, МЕ/г Нб × 10 ⁴ Catalase in red blood cells, IU/g Hb × 10 ⁴	3,93±0,11	4,34±0,10*	5,25±0,15	5,04±0,12 ^{^^^}
ЛДГ лимфоцитов, у. е. Lactate dehydrogenase, c. u.	5,20±0,44	5,54±0,28	4,87±0,41	3,41±0,35 ^{## ^^^}
СДГ лимфоцитов, у. е. Succinate dehydrogenase of lymphocytes, c. u.	1,13±0,30	1,71±0,32	0,97±0,26	1,45±0,19

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. As for Table 1.

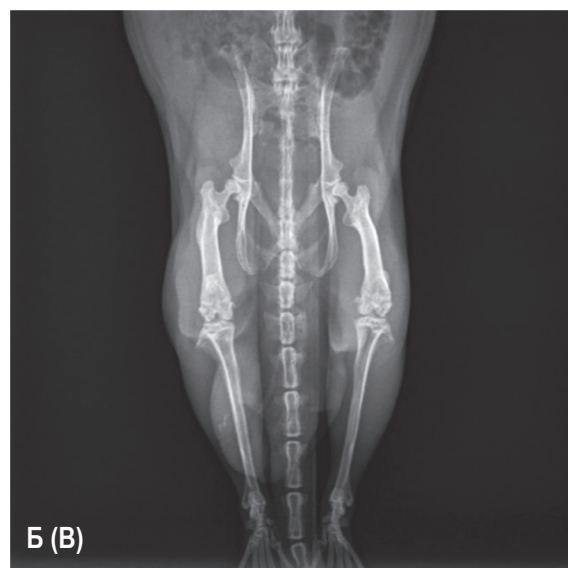


Рисунок 1. Рентгенографические исследования лабораторных животных (А – экспериментальное животное, Б – контрольное животное)

Figure 1. Radiological studies of laboratory animals (A, experimental animal; B, intact animal)

воспаление мягких околоуставных тканей, периостит и остеолитизис, анкилоз, что диагностируется инструментальными (МРТ), биохимическими и гистологическими методами исследований. Результаты наших исследований совпадают с описанной картиной и позволяют раскрыть ее более детально: на первом этапе выявлен острый воспалительный процесс, характеризующийся повышением общего количества лейкоцитов в крови, тромбоцитозом, окислительным стрессом на фоне активации ферментного звена антиоксидантной системы и усилением процессов энергообеспечения лимфоцитов; на втором этапе отмечается правый сдвиг в лейкоцитарной формуле, снижение признаков тромбоцитоза, сохраняющийся окислительный стресс с относительным ингибированием каталазы, уменьшение общей энергопродукции в лимфоцитах.

Высокая степень корреляции $r_{xy} = 0,87$ между радиусом лимфоцитов и активностью в них ЛДГ свидетельствует о морфо-функциональных преобразованиях иммунокомпетентных клеток, которые в силу нарушенного метаболического профиля и последовавшего за ним микроцитоза могут оказываться несостоятельными и способствовать усилению патологических реакций аутоиммунитета.

Моделирование патологий на лабораторных животных позволяет глубже вскрыть механизмы развития аутоиммунных заболеваний, однако необходимо принимать во внимание межвидовые особенности. Так, в нашей работе выявлены изменения в лейкоцитарной формуле в процессе развития индуцированной патологии, в частности наблюдалось достоверное ($p < 0,001$) снижение относительного содержания моноцитов: с 5,38% в контроле до 2,0% в опытной группе. Авторы работы [5] отмечают, что у детей с ювенильным артритом единственно фиксируемым изменением в лейкоцитарной формуле является увеличение количества моноцитов с 4,5% до 6,4% ($p < 0,05$). Другой особенностью ревматоидного артрита у людей является сопутствующая заболеванию анемия, которая встречается у 36-65%

пациентов [1]. В наших исследованиях установлена обратная тенденция: развитие адъювант-индуцированного аутоиммунного ревматоидного артрита сопровождалось у подопытных крыс усилением эритропоэза и, как следствие, ростом содержания в крови гемоглобина, концентрация которого увеличивалась не только относительно контрольной группы, но и возрастала по мере прогрессирования заболевания (сравнение групп «опыт 1» и «опыт 2»).

При естественных колебаниях активности СДГ у животных контрольной группы (контроль 1, контроль 2), оцениваемых в 16%, у крыс опытной группы (2-я и 7-я недели) отмечено константное превышение скорости субстратного окисления сукцината на 50% (опыт/контроль), что может отражать внутренние закономерности энергообеспечения лимфоцитов при патологии. Расчет соотношений ЛДГ/СДГ показывает, что для контрольных крыс дыхательный коэффициент варьирует незначительно — от 4,6 до 5,0, в то время как для опытной группы расчетные значения составляют 3,2 (2-я неделя) и 2,4 (7-я неделя). Следовательно, по мере развития заболевания доля процессов гликолиза в общей биоэнергетике клетки значительным образом снижается, что неизбежно отражается на росте, пролиферации и дифференцировке лимфоцитов.

Заключение

Нарушение механизмов иммунологической аутоотолерантности приводит к прогрессирующему снижению энергообеспечения в центральном эффекторном звене иммунной системы — лимфоцитах и сопровождается их микроцитозом. Патология протекает на фоне оксидативного стресса и осложняется рисками тромбообразования вследствие повышенного содержания в крови тромбоцитов. В этой связи в схемы лечения и профилактики аутоиммунных заболеваний целесообразно включать препараты, устраняющие энергодефицит и способствующие коррекции антиоксидантного статуса и системы гемостаза организма.

Список литературы / References

1. Ватутин Н.Т., Калинкина Н.В., Смирнова А.С. Анемия при ревматоидном артрите // Вестник Харьковского национального университета. Серия «Медицина», 2010. Т. 19, № 898. С. 76-82. [Vatutin N.T., Kalinkina N.V., Smirnova A.S. Anemia in rheumatoid arthritis. *Vestnik Kharkovskogo natsionalnogo universiteta. Seriya "Meditsina" = Bulletin of the Kharkiv National University. Series "Medicine"*, 2010, Vol. 19, no. 898, pp. 76-82. (In Russ.)]
2. Кондрашова М.Н., Захарченко М.В., Хундерякова Н.В., Маевский Е.И. Цитобиохимический способ определения активности сукцинатдегидрогеназы, окисления эндогенной янтарной кислоты, сигнального действия микромолярных концентраций янтарной кислоты, его применение для количественной оценки уровня адренергической регуляции в организме, среда и набор для осуществления // Патент РФ № 2364868. Патентообладатель Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН (ИТЭБ РАН), Кондрашова Мария Николаевна. Открытое акционерное общество «Диод»; опубликована

но 20.08.2009. [Kondrashova M.N., Zakharchenko M.V., Khunderiyakova N.V., Maevsky E.I. Cytobiochemical method of determining activity of succinate dehydrogenase, endogenic succinic acid oxidation, signal action of micromolecular concentrations of succinic acid, its application for quantitative evaluation of level of adrenergic regulation in organism, medium and set for method realisation. Patent RU 2364868 C1].

3. Методы клинических лабораторных исследований / Под ред. В.С. Камышникова. 8-е изд. М.: МЕД-пресс-информ, 2016. 736 с. [Methods of clinical laboratory research. Ed. V.S. Kamyshnikov. 8th ed.]. Moscow: MEDpress-inform, 2016. 736 p.

4. Москалец О.В. Роль инфекций в развитии аутоиммунных заболеваний // Казанский медицинский журнал, 2017. Т. 98, № 4. С. 586-591. [Moskalets O.V. Role of infections in autoimmune disease development. *Kazanskiy meditsinskiy zhurnal = Kazan Medical Journal*, 2017, Vol. 98, no. 4, pp. 586-591. (In Russ.)]

5. Пашнина И.А., Криволапова И.М., Козлова Е.С., Скоробогатова О.В. Иммунологические параметры у детей с артритом различной этиологии // Медицинская иммунология, 2011. Т. 13, № 4-5. С. 369-370. [Pashnina I.A., Krivolapova I.M., Kozlova E.S., Skorobogatova O.V. Immunological parameters in children with arthritis of various etiologies. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2011, Vol. 13, no. 4-5, pp. 369-370. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2011-4-5-369-370.

6. Справочник по лабораторным методам исследования / Под ред. Л.А. Даниловой. М.: Питер, 2003. 733 с. [Handbook of laboratory research methods. Ed. L.A. Danilova]. Moscow: Piter, 2003. 733 p.

7. Трошина Е.А., Юкина М.Ю., Нуралиева Н.Ф., Мокрышева Н.Г. Роль генов системы HLA: от аутоиммунных заболеваний до COVID-19 // Проблемы эндокринологии, 2020. Т. 66, № 4. С. 9-15. [Troshina E.A., Yukina M.Yu., Nuralieva N.F., Mokrysheva N.G. The role of HLA genes: from autoimmune diseases to covid-19. *Problemy endokrinologii = Endocrinology Problems*. 2020, Vol. 66, no. 4, pp. 9-15. (In Russ.)]

8. Шейбак В.М., Павлюковец А.Ю. Биохимическая гетерогенность Т-лимфоцитов // Вестник витебского государственного медицинского университета, 2018. Т. 17, № 6. С. 7-17. [Sheibak V.M., Pavlyukovets A.Yu. Biochemical heterogeneity of T lymphocytes. *Vestnik vitebskogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta = Vitebsk State Medical University Bulletin*, 2018, Vol. 17, no. 6, pp. 7-17. (In Russ.)]

9. Almeida L., Lochner M., Berod L., Sparwasser T. Metabolic pathways in T cell activation and lineage differentiation. *Semin. Immunol.*, 2016, Vol. 28, no. 5, pp. 514-524.

10. Anaya J.M., Shoenfeld Y., Rojas-Villarraga A., Levy R.A., Cervera R., editors. Autoimmunity: from bench to bedside [Internet]. Bogota (Colombia): El Rosario University Press. 2013. 856 p.

11. Apostólico J. de S., Lunardelli V.A., Coirada F.C., Boscardin S.B., Rosa D.S. Adjuvants: classification, modus operandi, and licensing. *J. Immunol. Res.*, 2016, Vol. 2016, 1459394. doi: 10.1155/2016/1459394.

12. Askanase A.D., Khalili L., Buyon J.P. Thoughts on COVID-19 and autoimmune diseases. *Lupus Sci. Med.*, 2020, Vol. 7, no. 1, 000396. doi: 10.1136/lupus-2020-000396.

13. Billiau A., Matthys P. Modes of action of Freund's adjuvants in experimental models of autoimmune diseases. *J. Leukoc. Biol.*, 2001, Vol. 70, no. 6, pp. 849-860.

14. Cui X., Wang R., Bian P., Wu Q., Seshadri V.D.D., Liu L. Evaluation of antiarthritic activity of nimbolide against Freund's adjuvant induced arthritis in rats. *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol.*, 2019, Vol. 47, no. 1, pp. 3391-3398.

15. Domblides C., Lartigue L., Faustin B. Metabolic Stress in the immune function of t cells, macrophages and dendritic cells. *Cells*, 2018, Vol. 7, no. 7, 68. doi: 10.3390/cells7070068.

16. Ehrenfeld M., Tincani A., Andreoli L., Cattalini M., Greenbaum A., Kanduc D., Alijotas-Reig J., Zinserling V., Semenova N., Amital H., Shoenfeld Y. COVID-19 and autoimmunity. *Autoimmun. Rev.*, 2020, Vol. 19, no. 8, 102597. doi: 10.1016/j.autrev.2020.102597.

17. Fontes J.A., Barin J.G., Talor M.V., Stickel N., Schaub J., Rose N.R., Čiháková D. Complete Freund's adjuvant induces experimental autoimmune myocarditis by enhancing IL-6 production during initiation of the immune response. *Immun. Inflamm. Dis.*, 2017, Vol. 5, no. 2, pp. 163-176.

18. Gerriets V.A., Rathmell J.C. Metabolic pathways in T cell fate and function. *Trends Immunol.*, 2012, Vol. 33, no. 4, pp. 168-173.

19. Halpert G., Shoenfeld Y. SARS-CoV-2, the autoimmune virus. *Autoimmun. Rev.*, 2020, Vol. 19, no. 12, 102695. doi: 10.1016/j.autrev.2020.102695.

20. Jacobson P.B., Morgan S.J., Wilcox D.M., Nguyen P., Ratajczak C.A., Carlson R.P., Harris R.R., Nuss M. A new spin on an old model: in vivo evaluation of disease progression by magnetic resonance imaging with respect to standard inflammatory parameters and histopathology in the adjuvant arthritic rat. *Arthritis Rheum.*, 1999, Vol. 42, no. 10, pp. 2060-2073.

21. Liu M., Gao Y., Zhang Y., Shi S., Chen Y., Tian J. The association between severe or dead COVID-19 and autoimmune diseases: A systematic review and meta-analysis. *J. Infect.*, 2020, Vol. 81, no. 3, pp. 93-95.

22. Lorente L., Martín M.M., Franco A., Barrios Y., Cáceres J.J., Solé-Violán J., Perez A., Ramos J.A.M.Y., Ramos-Gómez L., Ojeda N., Jiménez A., Working Group on COVID-19 Canary ICU; Annex. Members of the BIOMEPOC group. HLA genetic polymorphisms and prognosis of patients with COVID-19. *Med. Intensiva (Engl. Ed.)*, 2021, Vol. 45, no. 2, pp. 96-103.

23. Macintyre A.N., Gerriets V.A., Nichols A.G., Michalek R.D., Rudolph M.C., Deoliveira D., Anderson S.M., Abel E.D., Chen B.J., Hale L.P., Rathmell J.C. The glucose transporter Glut1 is selectively essential for CD4 T cell activation and effector function. *Cell Metab.*, 2014, Vol. 20, no. 1, pp. 61-72.

24. Maciver N.J., Jacobs S.R., Wieman H.L., Wofford J.A., Colloff J.L., Rathmell J.C. Glucose metabolism in lymphocytes is a regulated process with significant effects on immune cell function and survival. *J. Leukoc. Biol.*, 2008, Vol. 84, no. 4, pp. 949-957.
25. Nasonov E., Aleksandrova E.N., Novikov A.A. Autoimmune rheumatic diseases: results and prospects for esearches. *Rheumatol. Sci. Pract.*, 2015, Vol. 53, no. 3, pp. 230-237.
26. Yang Z., Matteson E.L., Goronzy J.J., Weyand C.M. T-cell metabolism in autoimmune disease. *Arthritis Res. Ther.*, 2015, Vol. 17, no. 1, 29. doi: 10.1186/s13075-015-0542-4.
27. Zhang P., Lu Q. Genetic and epigenetic influences on the loss of tolerance in autoimmunity. *Cell. Mol. Immunol.*, 2018, Vol. 15, no 6, pp. 575-585.
28. Zheng Y., Collins S.L., Lutz M.A., Allen A.N., Kole T.P., Zarek P.E., Powell J.D. A role for mammalian target of rapamycin in regulating T cell activation versus anergy. *J. Immunol.*, 2007, Vol. 178, no. 4, pp. 2163-2170.

Авторы:

Скупневский С.В. — д.б.н., ведущий научный сотрудник Института биомедицинских исследований — филиал ФГБУН «Федерального научного центра “Владикавказский научный центр Российской академии наук”», г. Владикавказ, Республика Северная Осетия — Алания, Россия

Пухова Е.Г. — младший научный сотрудник Института биомедицинских исследований — филиал ФГБУН «Федерального научного центра “Владикавказский научный центр Российской академии наук”», г. Владикавказ, Республика Северная Осетия — Алания, Россия

Бадтиева А.К. — к.б.н., научный сотрудник Института биомедицинских исследований — филиал ФГБУН «Федерального научного центра “Владикавказский научный центр Российской академии наук”», г. Владикавказ, Республика Северная Осетия — Алания, Россия

Рурба Ф.К. — младший научный сотрудник Института биомедицинских исследований — филиал ФГБУН «Федерального научного центра “Владикавказский научный центр Российской академии наук”», г. Владикавказ, Республика Северная Осетия — Алания, Россия

Батагова Ф.Э. — младший научный сотрудник Института биомедицинских исследований — филиал ФГБУН «Федерального научного центра “Владикавказский научный центр Российской академии наук”», г. Владикавказ, Республика Северная Осетия — Алания, Россия

Фарниева Ж.Г. — младший научный сотрудник Института биомедицинских исследований — филиал ФГБУН «Федерального научного центра “Владикавказский научный центр Российской академии наук”», г. Владикавказ, Республика Северная Осетия — Алания, Россия

Authors:

Skupnevsky S.V., PhD, MD (Biology), Leading Research Associate, Institute of Biomedical Investigations, Affiliation of Vladikavkaz Research Centre, Russian Academy of Sciences, Vladikavkaz, Republic of North Ossetia — Alania, Russian Federation

Pukhaeva E.G., Junior Research Associate, Institute of Biomedical Investigations, Affiliation of Vladikavkaz Research Centre, Russian Academy of Sciences, Vladikavkaz, Republic of North Ossetia — Alania, Russian Federation

Badatiev A.K., PhD (Biology), Senior Research Associate, Institute of Biomedical Investigations, Affiliation of Vladikavkaz Research Centre, Russian Academy of Sciences, Vladikavkaz, Republic of North Ossetia — Alania, Russian Federation

Rurba F.K., Junior Research Associate, Institute of Biomedical Investigations, Affiliation of Vladikavkaz Research Centre, Russian Academy of Sciences, Vladikavkaz, Republic of North Ossetia — Alania, Russian Federation

Butagova F.E., Junior Research Associate, Institute of Biomedical Investigations, Affiliation of Vladikavkaz Research Centre, Russian Academy of Sciences, Vladikavkaz, Republic of North Ossetia — Alania, Russian Federation

Farnieva Z.G., Junior Research Associate, Institute of Biomedical Investigations, Affiliation of Vladikavkaz Research Centre, Russian Academy of Sciences, Vladikavkaz, Republic of North Ossetia — Alania, Russian Federation

ВЛИЯНИЕ ПОЛИАМИНОВ БАКТЕРИАЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ НА ПРОДУКЦИЮ КЛЮЧЕВЫХ ЦИТОКИНОВ В КУЛЬТУРЕ МОНОНУКЛЕАРНЫХ ЛЕЙКОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА

Годовалов А.П., Карпунина Т.И.

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

Резюме. К настоящему времени подробно изучено участие биогенных полиаминов в регуляции экспрессии генов микроорганизмов, межмикробных отношений, формировании персистентного состояния, активно оценивается возможность их использования в качестве маркеров патологических состояний человека. Цель исследования — оценить влияние бактериальных диаминов — кадаверина и путресцина — на продукцию ключевых цитокинов (IFN γ и IL-4) в культуре моноклеарных лейкоцитов человека.

Объектом исследования служили лейкоциты периферической венозной крови, полученной от 18 практически здоровых мужчин-добровольцев (средний возраст — 24,0 $\pm$ 0,6 года). Выделение лейкоцитов проводили путем градиентного центрифугирования с использованием смеси фиколл-верографин. Для культивирования лимфоцитов использовали микрометод и пластиковые круглодонные 96-луночные планшеты. В качестве Т-клеточного митогена использовали конканавалин А в концентрации 5 мкг/мл. Полиамины использовали в конечных концентрациях 5, 25, 50, 75 и 100 мкМ/л. Культивирование осуществляли во влажной атмосфере с 5% CO $_2$ при 37 °С в течение 72 ч. По окончании срока инкубации культуральную жидкость стягивали и замораживали для последующего определения концентрации цитокинов с помощью реагентов для иммуноферментного определения концентрации IFN γ и IL-4 производства АО «Вектор-Бест» (Россия). Число жизнеспособных клеток учитывали с помощью камеры Горяева после окраски 0,1% раствором трипанового синего. Статистический анализ проводился с помощью критерия Стьюдента или Манна–Уитни.

Добавление кадаверина во всех концентрациях снижает продукцию IFN γ в культуре митоген-активированных клеток. В случае культивирования лейкоцитов в присутствии путресцина в концентрациях от 5 до 50 мкМ/л наблюдается дозозависимое снижение продукции IFN γ . При дальнейшем увеличении концентрации путресцина продукция IFN γ восстанавливается до значений контрольных проб. Выявлено прямое токсическое действие полиаминов на клетки. Оба диамина в концентрациях 50, 75 и 100 мкМ/л увеличивали продукцию IL-4 митоген-активированными клетками. Подобные изменения могут быть связаны как с прямым цитотоксическим действием кадаверина и путресцина, так и опосредованным через изменение ряда метаболических путей. Кроме этого, действие полиаминов

Адрес для переписки:

Годовалов Анатолий Петрович
ФГБОУ ВО «Пермский государственный медицинский университет имени академика Е.А. Вагнера»
Министерства здравоохранения РФ
614990, Россия, г. Пермь, ул. Петропавловская, 26.
Тел.: 8 (912) 981-51-00.
E-mail: AGodovalov@gmail.com

Address for correspondence:

Godovalov Anatoliy P.
E. Vagner Perm State Medical University
614990, Russian Federation, Perm, Petropavlovskaya str., 26.
Phone: 7 (912) 981-51-00.
E-mail: AGodovalov@gmail.com

Образец цитирования:

А.П. Годовалов, Т.И. Карпунина «Влияние полиаминов бактериального происхождения на продукцию ключевых цитокинов в культуре моноклеарных лейкоцитов человека» // Медицинская иммунология, 2022. Т. 24, № 2. С. 257-262.
doi: 10.15789/1563-0625-IOP-2399
© Годовалов А.П., Карпунина Т.И., 2022

For citation:

A.P. Godovalov, T.I. Karpunina "Influence of polyamines of bacterial origin on the production of key cytokines in the culture of human mononuclear leukocytes", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2022, Vol. 24, no. 2, pp. 257-262. doi: 10.15789/1563-0625-IOP-2399
DOI: 10.15789/1563-0625-IOP-2399

на присутствующие в культуре моноциты может поддерживать их противовоспалительный статус, что выражается в повышении продукции IL-4.

В целом кадаверин и путресцин, продуцируемые микроорганизмами различных таксономических групп, регулируют эффективность компенсаторно-приспособительных реакций, обеспечивающих адаптацию микробных популяций к изменяющимся или неблагоприятным условиям окружения.

Ключевые слова: кадаверин, путресцин, IFN γ , IL-4, мононуклеарные лейкоциты, цитокины

INFLUENCE OF POLYAMINES OF BACTERIAL ORIGIN ON THE PRODUCTION OF KEY CYTOKINES IN THE CULTURE OF HUMAN MONONUCLEAR LEUKOCYTES

Godovalov A.P., Karpunina T.I.

E. Vagner Perm State Medical University, Perm, Russian Federation

Abstract. To date, participation of biogenic polyamines has been studied in details, with respect to regulation of microbial gene expression, interrelations between bacteria, development of their persistence state. Opportunity of their use as markers of human pathological conditions is being actively evaluated. The aim of our study was to assess the effect of bacterial diamines, i.e., cadaverine and putrescine, upon production of key cytokines (IFN γ and IL-4) in the culture of human mononuclear leukocytes.

We studied leukocytes of peripheral venous blood obtained from 18 healthy male volunteers (mean age 24.0 $\pm$ 0.6 years). The leukocytes were isolated by means of gradient centrifugation using a Ficoll-Verografin mixture. For the cultivation of lymphocytes, a micro-method and plastic round-bottom 96-well plates were used. Concanavalin A at a concentration of 5 μ g/ml was used as a T cell mitogen. Polyamines were used at final concentrations of 5, 25, 50, 75 and 100 μ M/L. The cultivation was carried out in humidified atmosphere with 5% CO₂ at 37 °C for 72 hours. At the end of incubation, the culture medium was collected and frozen for subsequent quantitative enzyme immunoassays of cytokine concentrations (IFN γ and IL-4) (Russia). Viable cells were counted using Goryaev chamber after staining with 0.1% trypan blue solution. Statistical analysis was performed using Student's t test or Mann–Whitney test.

Addition of cadaverine at all concentrations reduced IFN γ production in the culture of mitogen-activated cells. When culturing leukocytes supplied with putrescine (5 to 50 μ M/L), a dose-dependent decrease of IFN γ was observed. Upon further increase of putrescine concentrations, the IFN γ production is restored to the values of the control samples. Direct toxic effect of polyamines upon the cells was revealed. Both the diamines, at the doses of 50, 75, and 100 μ M/L, caused increase of IL-4 production by the mitogen-activated cells. Such changes can be associated both with direct cytotoxic effect of cadaverine and putrescine, being mediated by changes of some metabolic pathways. In addition, the effects of polyamines upon monocytes present in culture can include their anti-inflammatory state, e.c., an increased IL-4 production.

In general, cadaverine and putrescine, produced by microorganisms of various taxonomic groups, regulate the effectiveness of compensatory-adaptive reactions that ensure adaptation of microbial populations to changing or unfavorable environmental conditions.

Keywords: cadaverine, putrescine, IFN γ , IL-4, mononuclear leukocytes, cytokines

Введение

В последнее время наблюдается увеличение интереса к бактериальным метаболитам, которые оказывают модулирующее влияние на участников микробных ассоциаций, меняют свойства микроорганизмов-симбионтов, участвуют в реализации адаптационных стратегий бактерий, что выражается в формировании длительной пер-

систенции микроорганизмов в биотопе. Особое место среди таких метаболитов занимают полиамины, поскольку играют роль жизнеобеспечивающих факторов, в частности при действии антибиотиков [3]. Достаточно детально изучена активность полиаминов по регуляции ряда генов микроорганизмов, что в итоге обеспечивает выживание *Escherichia coli* при окислительном стрессе [5], который может быть сформирован в

очаге воспаления [16]. Показано, что полиамины меняют чувствительность микроорганизмов к антибиотикам как планктонных, так и сессильных культур [1], активируют биопленкообразование [2]. В исследованиях Nakamura и соавт. [18] показано, что кадаверин участвует в регуляции синтеза факторов патогенности пневмококками: капсулы и некоторых белков. При дефиците соответствующего гена формируются аттенуированные штаммы *S. pneumoniae*. Torres A.G. [20] установлено, что кадаверин нарушает взаимодействие шигелл с полиморфноядерными лейкоцитами, что обеспечивает дальнейшее развитие инфекции.

Несмотря на существенную биологическую роль полиаминов в организме человека, описан их токсический эффект. Показано, что кадаверин и путресцин оказывают влияние на сосудистую стенку, расслабляют ее гладкомышечную оболочку [13]. Кроме этого, негативный эффект этих диаминов опосредуется через усиление эффекта других аминов, например гистамина [9]. Оба диамина участвуют в метаболическом пути синтеза нитрозаминов, обладающих канцерогенным действием [13]. Вместе с тем относительно мало данных о влиянии полиаминов бактериального происхождения на функциональную активность иммунокомпетентных клеток. В исследованиях *in vitro* установлено, что при активации лимфоцитов фитогемагглютинином повышается концентрация путресцина, спермина и спермидина [10].

Цель исследования — оценить влияние бактериальных диаминов кадаверина и путресцина на продукцию ключевых цитокинов IFN γ и IL-4 в культуре мононуклеарных лейкоцитов человека.

Материалы и методы

Объектом исследования служили лейкоциты периферической венозной крови, полученной от 18 практически здоровых мужчин-добровольцев (средний возраст — $24,0 \pm 0,6$ года). Критерием невключения служила принадлежность к женскому полу, поскольку активность лейкоцитов человека находится под влиянием женских половых гормонов, уровень которых циклически меняется [6]. Выделение лейкоцитов проводили из гепаринизированной крови путем градиентного центрифугирования с использованием смеси фикоколл-верографин с плотностью $1,078 \text{ г/см}^3$. После сбора интерфазной части клеточную взвесь перемешивали и трижды отмывали. Для культивирования лимфоцитов использовали микрометод и пластиковые круглодонные 96-луночные планшеты. Каждая культура содержала 2×10^5 клеток в 0,2 мл полной культуральной среды. Последнюю готовили *ex tempore* на основе среды 199 с добавлением 2 mM L-глутамина, 10 mM HEPES (N-2-

гидроксиэтилпиперазин-N'-2-этансульфоновая кислота), 100 мкг/мл гентамицина сульфата и 10% аутоплазмы. В качестве Т-клеточного митогена использовали конканавалин А в концентрации 5 мкг/мл. Полиамины использовали в конечных концентрациях 5, 25, 50, 75 и 100 мкМ/л. Культивирование осуществляли во влажной атмосфере с 5% CO $_2$ при 37 °C в течение 72 ч. По окончании срока инкубации культуральную жидкость стягивали и замораживали для последующего определения концентрации цитокинов. Использовали наборы реагентов для иммуноферментного определения концентрации IFN γ и IL-4 производства АО «Вектор-Бест» (Россия).

Число жизнеспособных клеток учитывали с помощью камеры Горяева после окраски 0,1% раствором трипанового синего.

Статистический анализ проводился с помощью программного пакета Statistica 6.0. Вычислялась средняя арифметическая величина (M) и стандартная ошибка средней арифметической (m). Для проверки нормальности распределения использован критерий Шапиро—Уилка. В случае распределения приближенного к нормальному использовали критерий Стьюдента, в остальных — применяли критерий Манна—Уитни для оценки значимости различий. Критический уровень значимости (p) при проверке статистических гипотез принимался равным 0,05.

Результаты

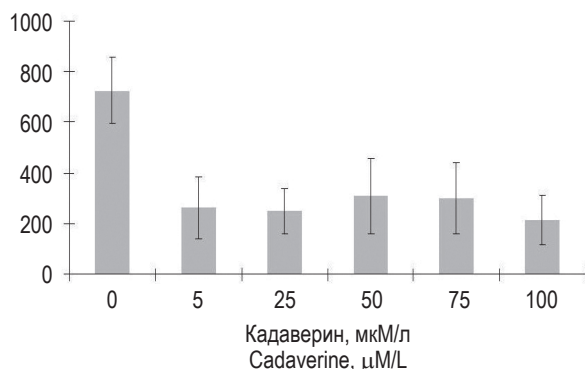
Показано, что кадаверин во всех использованных в настоящем исследовании концентрациях снижал способность лейкоцитов к продукции IFN γ (рис. 1А). Такая картина может быть обусловлена как подавлением пролиферации лейкоцитов, так и прямым токсическим действием на них.

В случае культивирования лейкоцитов в присутствии путресцина в концентрациях от 5 до 50 мкМ/л наблюдается дозозависимое снижение продукции IFN γ . При дальнейшем увеличении концентрации путресцина продукция IFN γ восстанавливается до значений контрольных проб (рис. 1Б).

Показано прогрессивное снижение числа жизнеспособных клеток в пробах с полиаминами. Так, при концентрации путресцина 100 мкМ/л жизнеспособных клеток было 486 ± 199 в 1 мкл, при 100 мкМ/л кадаверина — 192 ± 81 в 1 мкл, а в контрольных пробах — 1521 ± 380 в 1 мкл ($p < 0,05$ к пробам с кадаверином и путресцином).

При анализе влияния полиаминов бактериального происхождения на продукцию IL-4 выявлена общая закономерность для путресцина и кадаверина (рис. 2). Оба диамина в концентрациях 50, 75 и 100 мкМ/л увеличивали синтетиче-

А (A)



Б (B)

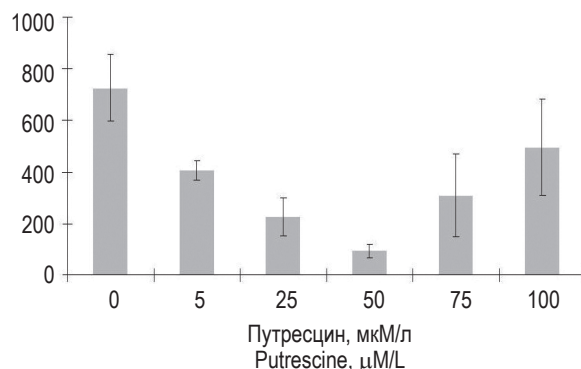
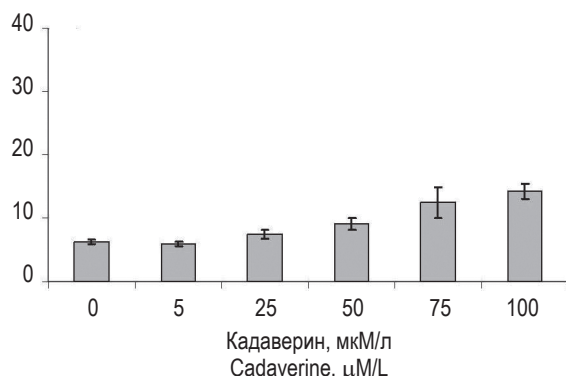


Рисунок 1. Концентрация IFNγ в культурах мононуклеарных лейкоцитов человека под влиянием кадаверина (А) и путресцина (Б)

Figure 1. Concentration of IFNγ in cultures of human mononuclear leukocytes under the influence of cadaverine (A) and putrescine (B)

А (A)



Б (B)

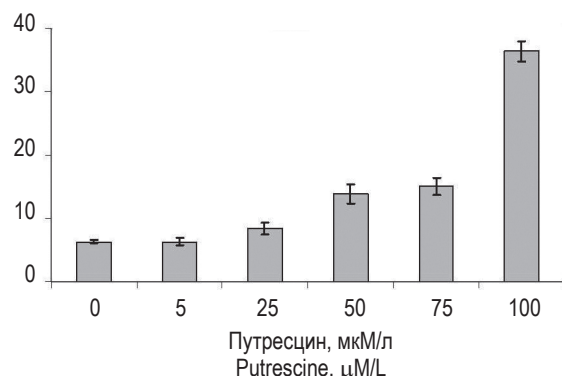


Рисунок 2. Концентрация IL-4 в культурах мононуклеарных лейкоцитов человека под влиянием кадаверина (А) и путресцина (Б)

Figure 2. Concentration of IL-4 in cultures of human mononuclear leukocytes under the influence of cadaverine (A) and putrescine (B)

скую активность лейкоцитов. При этом в пробах с 100 мкМ/л путресцина уровень IL-4 существенно выше, чем в пробах с аналогичной концентрацией кадаверина.

Обсуждение

В ранее проведенных исследованиях с использованием культуры клеток HT29 показано, что в концентрациях выше 20 мМ путресцин и кадаверин дозозависимо уменьшали численность клеток, а также существенно меняли их морфологию [9]. Для мононуклеарных лейкоцитов в настоящем исследовании установлен аналогичный эффект. Как показано в исследованиях del Rio и соавт. цитотоксичность высоких концентраций путресцина и кадаверина проявляется по типу некроза [9]. Однако по сравнению с цитоток-

сичностью других полиаминов у кадаверина и путресцина эта активность сравнительно низкая [15]. Некротический тип цитотоксичности можно объяснить тем, что благодаря своей поликатионной природе, оба диамин могут вступать во взаимодействие с фосфолипидами, что приводит к дестабилизации клеточной мембраны [24]. Соответственно, при высоком содержании поликатионов такое взаимодействие с компонентами мембраны клетки становится критичным.

При помощи модельной инфекции, обусловленной энтеробактериями, было показано, что кадаверин принимает участие в подавлении провоспалительного иммунного ответа [11, 17]. В настоящем исследовании снижение продукции IFNγ может быть обусловлено формированием окисленных продуктов из полиаминов, кото-

рые обладают иммуносупрессивной активностью [12]. При этом снижение концентрации полиаминов коррелирует со снижением синтеза ДНК [10]. В исследованиях [8] в культуре лимфоцитов, активированных митогеном лаконоса (PWM), показано, что кадаверин тормозит созревание В-лимфоцитов в плазматические клетки, в результате чего снижается продукция IgG. Подобную картину авторы связывают с непрямым действием кадаверина, опосредованным через снижение продукции хелперных факторов активированными митогеном лимфоцитами. Теми же авторами показано, что эффект кадаверина обратимый, и лимфоциты способны восстанавливать пролиферативную активность в ответ на митоген.

Повышение продукции противовоспалительного IL-4 можно связать с возможным присутствием в культуре определенного количества моноцитов, которые под влиянием полиаминов увеличивают свой противовоспалительный потенциал [21, 22]. При этом происходит трансформация моноцитов по альтернативному пути, что может менять функциональную активность лимфоцитов [14]. Обсуждается вопрос участия

АМФ-активированной протеинкиназы в перепрограммировании моноцитов под влиянием полиаминов [19, 23].

Заключение

Таким образом, оценивая прослеженные эффекты диаминов бактериального происхождения, можно полагать, что кадаверин и путресцин также представляют собой внеклеточные адаптогены, подобные специфическим метаболитам, которые, по мнению Николаева Ю.А. и соавт. [4, 7], микроорганизмы различных таксономических групп способны синтезировать, и чьи функции заключаются в регуляции эффективности компенсаторно-приспособительных реакций, обеспечивающих адаптацию микробных популяций к изменяющимся или неблагоприятным условиям окружения. Защитные эффекты бактериальных полиаминов при инфекции и микробной персистенции, в зависимости от их химической структуры, могут реализоваться через протекцию бактериальных клеток от повреждающих воздействий эффекторов защиты макроорганизма.

Список литературы / References

1. Нестерова Л.Ю., Ахова А.В., Шумков М.С., Ткаченко А.Г. ДНК-протекторное действие полиаминов как фактор резистентности *Escherichia coli* к левофлоксацину // Вестник Пермского университета. Серия: Биология, 2016. № 1. С. 54-59. [Nesterova L.Yu., Ahova A.V., Shumkov M.S., Tkachenko A.G. DNA-protective action of polyamines as a factor of resistance of *Escherichia coli* to levofloxacin. *Vestnik Permskogo universiteta. Seriya: Biologiya = Bulletin of Perm University. Series: Biology*, 2016, no. 1, pp. 54-59. (In Russ.)]
2. Нестерова Л.Ю., Караваева Е.А., Ткаченко А.Г. Полиамины как регуляторы биоплёнокообразования природных изолятов *Escherichia coli* с разной степенью устойчивости к фторхинолонам // Вестник Пермского университета. Серия: Биология, 2011. № 2. С. 32-37. [Nesterova L.Yu., Karavaeva E.A., Tkachenko A.G. Polyamines as regulators of biofilm formation in natural isolates of *Escherichia coli* with different degrees of resistance to fluoroquinolones. *Vestnik Permskogo universiteta. Seriya: Biologiya = Bulletin of Perm University. Series: Biology*, 2011, no. 2, pp. 32-37. (In Russ.)]
3. Нестерова Л.Ю., Цыганов И.В., Ткаченко А.Г. Влияние биогенных полиаминов на антибиотикочувствительность и поверхностные свойства клеток *Mycobacterium smegmatis* // Прикладная биохимия и микробиология, 2020. Т. 56, № 4. С. 342-351. [Nesterova L.Yu., Tsyganov I.V., Tkachenko A.G. Influence of biogenic polyamines on antibiotic sensitivity and surface properties of *Mycobacterium smegmatis* cells. *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya = Applied Biochemistry and Microbiology*, 2020, Vol. 56, no. 4, pp. 342-351. (In Russ.)]
4. Николаев Ю.А., Мулюкин А.Л., Степаненко И.Ю., Эль-Регистан Г.И. Ауторегуляция стрессового ответа микроорганизмов // Микробиология, 2006. Т. 75, № 4. С. 489. [Nikolaev Yu.A., Mulyukin A.L., Stepanenko I.Yu., El-Registan G.I. Autoregulation of stress response of microorganisms. *Mikrobiologiya = Microbiology*, 2006, Vol. 75, no. 4, p. 489. (In Russ.)]
5. Ткаченко А.Г., Нестерова Л.Ю. Полиамины как модуляторы экспрессии генов окислительного стресса у *Escherichia coli* // Биохимия, 2003. Т. 68, № 8. С. 1040-1048. [Tkachenko A.G., Nesterova L.Yu. Polyamines as modulators of oxidative stress gene expression in *Escherichia coli*. *Biokhimiya = Biochemistry*, 2003, Vol. 68, no. 8, pp. 1040-1048. (In Russ.)]
6. Шилов Ю.И., Шилов С.Ю., Жукова А.Е., Барков С.Ю., Петухова А.А. Изменение уровня ацидификации фагосом у крыс в зависимости от фазы эстрального цикла // Российский иммунологический журнал, 2016. Т. 10, № 2. С. 183-184. [Shilov Yu.I., Shilov S.Yu., Zhukova A.E., Barkov S.Yu., Petukhova A.A. Changes in the level of acidification of phagosomes in rats depending on the phase of the estrous cycle. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2016, Vol. 10, no. 2, pp. 183-184. (In Russ.)]
7. Эль-Регистан Г.И., Николаев Ю.А., Мулюкин А.Л., Лойко Н.Г., Демкина Е.В., Писарев В.М., Гапонов А.М., Тутельян А.В. Явление персистенции – формы и механизмы выживаемости популяций // Медицинский алфавит, 2014. Т. 2, № 10. С. 49-54. [El-Registan G.I., Nikolaev Yu.A., Mulyukin A.L., Loiko N.G.,

Demkina E.V., Pisarev V.M., Gaponov A.M., Tutelian A.V. The phenomenon of persistence – forms and mechanisms of population survival. *Meditsinskiy alfavit = Medical Alphabet*, 2014, Vol. 2, no. 10, pp. 49-54. (In Russ.)]

8. de Boccardo G., Drayer D., Rubin A.L., Novogrodsky A., Reidenberg M.M., Stenzel K.H. Inhibition of pokeweed mitogen-induced B cell differentiation by compounds containing primary amine or hydrazine groups. *Clin. Exp. Immunol.*, 1985, Vol. 59, no. 1, pp. 69-76.

9. del Rio B., Redruello B., Linares D.M., Ladero V., Ruas-Madiedo P., Fernandez M., Martin M.C., Alvarez M.A. The biogenic amines putrescine and cadaverine show *in vitro* cytotoxicity at concentrations that can be found in foods. *Sci. Rep.*, 2019, Vol. 9, no. 1, 120. doi: 10.1038/s41598-018-36239-w.

10. Hölttä E., Jänne J., Hovi T. Suppression of the formation of polyamines and macromolecules by DL-alpha-difluoromethylornithine and methylglyoxal bis(guanylhydrazine) in phytohaemagglutinin-activated human lymphocytes. *Biochem. J.*, 1979, Vol. 178, no. 1, pp. 109-117.

11. Köhler H., Rodrigues S.P., Maurelli A.T., McCormick B.A. Inhibition of *Salmonella typhimurium* enteropathogenicity by piperidine, a metabolite of the polyamine cadaverine. *J. Infect. Dis.*, 2002, Vol. 186, no. 8, pp. 1122-1130.

12. Labib R.S., Tomasi T.B. Jr. Enzymatic oxidation of polyamines. Relationship to immunosuppressive properties. *Eur. J. Immunol.*, 1981, Vol. 11, no. 3, pp. 266-269.

13. Ladero V., Calles-Enríquez M., Fernández M., Alvarez M.A. Toxicological effects of dietary biogenic amines. *Curr. Nutr. Food Sci.*, 2010, no. 6, pp. 145-156.

14. Latour Y.L., Gobert A.P., Wilson K.T. The role of polyamines in the regulation of macrophage polarization and function. *Amino Acids*, 2020, Vol. 52, no. 2, pp. 151-160.

15. Linares D.M., del Rio B., Redruello B., Ladero V., Martin M.C., Fernandez M., Ruas-Madiedo P., Alvarez M.A. Comparative analysis of the *in vitro* cytotoxicity of the dietary biogenic amines tyramine and histamine. *Food Chem.*, 2016, Vol. 197, Pt A, pp. 658-663.

16. Lugin J., Rosenblatt-Velin N., Parapanov R., Liaudet L. The role of oxidative stress during inflammatory processes. *Biol. Chem.*, 2014, Vol. 395, no. 2, pp. 203-230.

17. McCormick B.A., Fernandez M.I., Siber A.M., Maurelli A.T. Inhibition of *Shigella flexneri*-induced transepithelial migration of polymorphonuclear leucocytes by cadaverine. *Cell Microbiol.*, 1999, Vol. 1, no. 2, pp. 143-155.

18. Nakamya M.F., Ayoola M.B., Park S., Shack L.A., Swiatlo E., Nanduri B. The role of cadaverine synthesis on pneumococcal capsule and protein expression. *Med. Sci. (Basel)*, 2018, Vol. 6, no. 1, 8. doi: 10.3390/medsci6010008.

19. Rabinovitch R.C., Samborska B., Faubert B., Ma E.H., Gravel S.P., Andrzejewski S., Raissi T.C., Pause A., St-Pierre J., Jones R.G. AMPK maintains cellular metabolic homeostasis through regulation of mitochondrial reactive oxygen species. *Cell Rep.*, 2017, Vol. 21, no. 1, pp. 1-9.

20. Torres A.G. The cad locus of Enterobacteriaceae: more than just lysine decarboxylation. *Anaerobe*, 2009, Vol. 15, no. 1-2, pp. 1-6.

21. Zhang M., Borovikova L.V., Wang H., Metz C., Tracey K.J. Spermine inhibition of monocyte activation and inflammation. *Mol. Med.*, 1999, Vol. 5, no. 9, pp. 595-605.

22. Zhang M., Caragine T., Wang H., Cohen P.S., Botchkina G., Soda K., Bianchi M., Ulrich P., Cerami A., Sherry B., Tracey K.J. Spermine inhibits proinflammatory cytokine synthesis in human mononuclear cells: a counterregulatory mechanism that restrains the immune response. *J. Exp. Med.*, 1997, Vol. 185, no. 10, pp. 1759-1768.

23. Zhou S., Gu J., Liu R., Wei S., Wang Q., Shen H., Dai Y., Zhou H., Zhang F., Lu L. Spermine alleviates acute liver injury by inhibiting liver-resident macrophage pro-inflammatory response through ATG5-dependent autophagy. *Front. Immunol.*, 2018, no. 9, 948. doi: 10.3389/fimmu.2018.00948.

24. Zheliaskova A., Naydenova S., Petrov A.G. Interaction of phospholipid bilayers with polyamines of different length. *Eur. Biophys. J.*, 2000, Vol. 29, no. 2, pp. 153-157.

Авторы:

Годовалов А.П. — к.м.н., доцент кафедры микробиологии и вирусологии ФГБОУ ВО «Пермский государственный медицинский университет имени академика Е.А. Вагнера» Министерства здравоохранения РФ, г. Пермь, Россия

Карпунина Т.И. — д.б.н., профессор, профессор кафедры микробиологии и вирусологии ФГБОУ ВО «Пермский государственный медицинский университет имени академика Е.А. Вагнера» Министерства здравоохранения РФ, г. Пермь, Россия

Authors:

Godovalov A.P., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Microbiology and Virology, E. Vagner Perm State Medical University, Perm, Russian Federation

Karpunina T.I., PhD, MD (Biology), Professor, Department of Microbiology and Virology, E. Vagner Perm State Medical University, Perm, Russian Federation

Поступила 12.09.2021
Принята к печати 07.11.2021

Received 12.09.2021
Accepted 07.11.2021

РОЛЬ ЛЕЙКОЦИТОВ В ПОВРЕЖДЕНИИ ПЕЧЕНИ ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ САХАРНОГО ДИАБЕТА 1 И 2 ТИПА

Байкенова М.Б.^{1,2}, Соколова К.В.¹, Гетте И.Ф.¹, Данилова И.Г.¹

¹ ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук, г. Екатеринбург, Россия

² ФГАОУ ВО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина», г. Екатеринбург, Россия

Резюме. Сахарный диабет — это метаболическое расстройство, которое возникает в результате недостаточной секреции инсулина и/или его действия, что в результате приводит к возникновению гипергликемии. Известно, что поражение печени является одним из распространенных осложнений сахарного диабета 2 типа (СД2) и нередко встречается при диабете 1 типа (СД1). Сравнение распределения лейкоцитов с различным фенотипом в ткани печени с показателями крови может стать основой для диагностики степени поражения печени и поиска методов коррекции деструктивных изменений в печени при сахарном диабете. На основании вышеизложенного целью данного исследования была оценка изменения маркеров поражения печени в крови и количества лейкоцитов (CD45⁺ клеток), Т-лимфоцитов (CD3⁺ клеток) и макрофагов в печени при экспериментальном сахарном диабете 1 и 2 типа. Эксперимент был выполнен на 30 крысах-самцах линии Wistar. Для моделирования СД1 использовали аллоксан в дозе 170 мг/кг массы тела. Для создания модели СД2 животным вводили стрептозотозин и никотинамид в дозах 65 мг/кг и 110 мг/кг. Группой сравнения служили интактные животные. Были выполнены биохимические, гематологические, иммуногистохимические и морфометрические методы исследования. При моделировании СД1 и СД2 были получены близкие значения содержания глюкозы (соответственно, $10,88 \pm 0,47$ ммоль/л и $10,78 \pm 0,42$ ммоль/л) и гликированного гемоглобина (соответственно, $6,73 \pm 0,78\%$ и $6,60 \pm 0,20\%$), превышающие значения интактных крыс ($5,20 \pm 0,40$ ммоль/л и $4,07 \pm 0,30\%$). В то же время увеличение общего количества лейкоцитов и фракции лимфоцитов периферической крови относительно нормы было более выраженным в группе СД2, чем в группе СД1. В печени крыс обеих диабетических групп обнаружено увеличение количества синусоидальных клеток, макрофагов, CD45⁺ клеток и CD3⁺ клеток относительно показателей интактной группы, но у крыс группы СД1 CD45⁺ клетки располагались в большем количестве в паренхиме печени, а у крыс группы СД2 — синусоидально. При сходной степени увеличения количества макрофагов и общего количества CD45⁺ клеток, было выявлено более значительное количество синусоидальных клеток и CD3⁺ клеток, расположенных как в паренхиме, так и периваскулярно, у крыс группы СД2 по сравнению с показателем группы СД1. Увеличение активности АЛТ подтверждает более значительное повреждение клеток печени у животных группы СД2, тогда как в группе СД1 повышенная активность АСТ и менее выраженное увеличение активности АЛТ свидетельствуют о цитолизе без преимущественной локализации. Результаты исследования показали, что, несмотря на сходный уровень гипергликемии, воспалительный процесс на уровне целого организма и местный

Адрес для переписки:

Байкенова Мадина Багатчановна
ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии»
Уральского отделения Российской академии наук,
620049, Россия, г. Екатеринбург,
ул. Первомайская, 106.
Тел.: 8 (912) 288-94-70.
E-mail: m.b.baikenova@urfu.ru

Address for correspondence:

Baykenova Madina B.
Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch,
Russian Academy of Science
620049, Russian Federation, Yekaterinburg,
Pervomaiskaya str., 106.
Phone: 7 (912) 288-94-70.
E-mail: m.b.baikenova@urfu.ru

Образец цитирования:

М.Б. Байкенова, К.В. Соколова, И.Ф. Гетте, И.Г. Данилова «Роль лейкоцитов в повреждении печени при моделировании сахарного диабета 1 и 2 типа» // Медицинская иммунология, 2022. Т. 24, № 2. С. 263–272. doi: 10.15789/1563-0625-ROL-2368
© Байкенова М.Б. и соавт., 2022

For citation:

M.B. Baykenova, K.V. Sokolova, I.F. Gette, I.G. Danilova
“Role of leucocytes in liver damage in experimental models of type 1 and 2 diabetes mellitus”, Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2022, Vol. 24, no. 2, pp. 263–272. doi: 10.15789/1563-0625-ROL-2368
DOI: 10.15789/1563-0625-ROL-2368

воспалительный процесс в печени более выражен в группе СД2, и более значительная выраженность воспалительного процесса и повреждения печени соответствует увеличению синусоидальных клеток и инфильтрации печени CD3⁺ клетками.

Ключевые слова: сахарный диабет, печень, повреждение, лейкоциты, лимфоциты, макрофаги

ROLE OF LEUCOCYTES IN LIVER DAMAGE IN EXPERIMENTAL MODELS OF TYPE 1 AND 2 DIABETES MELLITUS

Baykenova M.B.^{a, b}, Sokolova K.V.^a, Gette I.F.^a, Danilova I.G.^a

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

^b B. Yeltsin Ural Federal University, Yekaterinburg, Russian Federation

Abstract. Diabetes mellitus is a metabolic disorder, which results from insufficient secretion of insulin and/or its action, thus leading to hyperglycemia. Liver damage is known to be among the most common complications of type 2 diabetes mellitus (T2D) and is common in T1D. Comparison of the leukocyte phenotypes in liver tissue with appropriate blood parameters may assess degree of liver damage and search for approaches to correction of liver destruction in diabetes mellitus. Therefore, we aimed for assessment of changes in liver injury markers in blood and the numbers of leucocytes (CD45⁺ cells), T lymphocytes (CD3⁺ cells) and macrophages in the liver in experimental models of types 1 and 2 diabetes. The experiment was conducted on 30 male Wistar rats. Alloxan at the dose of 170 mg/kg of body weight was used for T1D modeling. To provide a model of T2D, streptozotocin and nicotinamide were injected at the doses of 65 mg/kg, and 110 mg/kg respectively. Intact animals were used as a comparison control. Biochemical, hematological, immunohistochemical and morphometrical methods were used in the study. In T1D and T2D groups, levels of glucose (10.88 ± 0.47 mmol/l and 10.78 ± 0.42 mmol/l) and glycosylated hemoglobin ($6.73 \pm 0.78\%$ and $6.60 \pm 0.20\%$ correspondingly) were rather close to each other and exceeded the values of intact rats (5.20 ± 0.40 mmol/l and $4.07 \pm 0.30\%$). At the same time, the increase in total leucocyte number and fraction of peripheral blood leucocytes against normal levels were more pronounced in the T2D group than in T1D group. In liver of rats from the both diabetic groups, increased numbers of sinusoidal cells, macrophages, CD45⁺ cells and CD3⁺ cells relative to intact rats were detected. However, in rats from T1D group, CD45⁺ cells were distributed, mainly, in the liver parenchyma, whereas in rats in T2D group they showed sinusoidal location. At a similar degree of increasing macrophage numbers, and total CD45⁺ cells number, higher counts of sinusoidal cells and CD3⁺ cells, located both in the parenchyma and perivascular area, were found in rats of T2DM group compared with this parameter in T1DM group. An increase in ALT activity confirms a more significant damage to liver cells in animals of the T2DM group, whereas, in T1DM group, an increased AST activity and a less pronounced increase in ALT activity indicate uniformly distributed cytolysis. The results of our study showed, that, despite similar hyperglycemia level, the inflammatory process at the level of the whole organism and local inflammatory process in the liver are more pronounced in the T2DM group. A more significant severity of inflammatory process and liver damage corresponds to increase in sinusoidal cells and CD3⁺ cell infiltration of liver tissue.

Keywords: diabetes mellitus, liver, damage, leukocytes, lymphocytes, macrophages

Введение

Сахарный диабет (СД) сопровождается нарушением углеводного, белкового и липидного обмена, развитием хронических осложнений и поражением всех органов и систем организма, в том числе и печени [1, 5]. Поражение печени у больных СД описывают как неалкогольную жировую болезнь печени, которая характеризуется такими состояниями как стеатоз, стеатогепатит и, по дан-

ным разных авторов, обнаруживается у 35-100% больных сахарным диабетом 2 типа (СД2) [6, 8, 15, 24] и у 8,8-30% больных сахарным диабетом 1 типа (СД1) [11, 23]. У больных СД2 неалкогольную жировую болезнь печени связывают с метаболическим синдромом. При отсутствии лечения стеатоз прогрессирует, осложняется фиброзом и развитием цирроза печени, реже – гепатоцеллюлярной карциномы [14].

Печень ответственна за поддержание уровня аминокислот, белков, липидов, глюкозы в крови. В печени синтезируются липопротеиды очень низкой и высокой плотности (ЛПОНП и ЛПВП), необходимые для транспорта триацилглицеринов и холестерина. Печень секретирует большинство белков крови, в том числе белки острой фазы, хемокины и цитокины, а также содержит разнообразные популяции резидентных иммунных клеток [17]. Для регуляции гомеостаза глюкозы в печени осуществляется гликолиз, гликогенолиз, гликогенез, глюконеогенез [10]. В то же время поступление глюкозы в клетки печени зависит от инсулина, способствующего встраиванию транспортера глюкозы Glut-4 в наружную цитоплазматическую мембрану. При абсолютной или относительной недостаточности инсулина недоступность глюкозы для инсулинзависимых органов, в том числе печени, вызывает усиление липолиза в результате действия контринсулярных гормонов.

В механизме развития жирового перерождения печени при диабете выделяют два этапа. На первом этапе увеличивается поступление высвободившихся при липолизе свободных жирных кислот в гепатоциты и звездчатые клетки, снижается скорость β -окисления жирных кислот в митохондриях этих клеток, также уменьшается удаление из гепатоцитов ЛПОНП, содержащих значительное количество триацилглицеринов, что приводит к увеличению липидных вакуолей [6, 8, 12]. На втором этапе усиливается свободнорадикальное окисление жирных кислот, являющихся объектом атаки активных форм кислорода. Кроме того, избыток глюкозы в крови при СД является прооксидантным фактором. Развивается окислительный стресс, способствующий разрушению мембран и гибели гепатоцитов посредством некроза или апоптоза [6, 8, 16]. Известно, что окислительный стресс в печени при СД активирует транскрипцию проапоптотических генов [21] и сопровождается увеличением проапоптотических факторов, таких как каспаза-3 [18].

В печени при СД, как и в остальных органах, в ответ на высвобождение метаболитов из погибших клеток и гликирование белков развивается воспалительная реакция. Исследования последних лет свидетельствуют о наличии аутоиммунной агрессии в отношении β -клеток при СД1 и инсулиновых рецепторов при СД2 в начале заболевания и о повсеместных аутоиммунных реакциях в последующем [1].

В ответ на повреждение в печени развиваются компенсаторные восстановительные процессы. Воспаление в печени может как усугублять тяжесть течения заболевания, так и ограничить

степень поражения гепатоцитов, что способствует восстановлению поврежденных структур и способствует восстановлению гомеостаза [16, 22]. При ускоренном повреждении клеток печени, опережающем восстановительный рост, усиливается отложение элементов соединительной ткани, замещающих потерю гепатоцитов, что приводит к развитию фиброза. Процессы разрушения печени и процессы регенерации регулируются резидентными иммунокомпетентными клетками (клетками Купфера, тучными клетками) и лейкоцитами, в том числе моноцитами, поступающими в печень в ответ на вырабатываемые клетками Купфера хемоаттрактанты [22]. Деструктивные процессы в печени осуществляются нейтрофилами, различными фракциями Т-лимфоцитов, инфильтрующими ткань печени, при посредстве провоспалительных цитокинов, таких как $\text{TNF}\alpha$, IL-1 , IL-6 [8, 14, 16].

Биопсия печени является «золотым стандартом» для диагностики стеатоза [15], но чаще в клинике определяют активность аминотрансфераз и щелочной фосфатазы, спектр липидов и провоспалительные факторы [16]. В эксперименте у крыс со стрептозотоциновым СД1 также обнаружено увеличение активности аминотрансфераз, щелочной фосфатазы, провоспалительных цитокинов, С-реактивного белка, $\text{TNF}\alpha$, IL-6 и продукта свободнорадикального окисления — малонового диальдегида (MDA) [12, 18]. Изменение количества различных фракций лейкоцитов периферической крови может свидетельствовать о воспалительном процессе при СД на уровне целого организма и печени, в частности соотношение фракций нейтрофилов и лимфоцитов используют для оценки степени стеатоза [13]. Сравнение показателей печеночного профиля в крови с распределением лейкоцитов в печени может иметь диагностическое значение, но оценка инфильтрации печени лейкоцитами доступна преимущественно в эксперименте. Выяснение роли лейкоцитов в процессах повреждения и восстановления печени может стать основой для поиска способов коррекции деструктивных изменений в печени при СД, однако локализация лейкоцитов в паренхиме печени и в пространстве вокруг сосудов исследована недостаточно. Сравнению особенностей поражения печени при СД1 и СД2 также уделяется мало внимания [11], поражение печени исследуется преимущественно при СД2 [6, 8, 13, 15, 16], и одиночные исследования проводятся при СД1 [12, 23].

Цель работы — оценить изменение маркеров поражения печени в крови и количества лейкоцитов (CD45^+ клеток), Т-лимфоцитов (CD3^+ клеток) и макрофагов в печени при экспериментальном сахарном диабете 1 и 2 типа.

Материалы и методы

Экспериментальные животные

Эксперимент был выполнен на 30 крысах-самцах линии Wistar массой 300–340 г в соответствии с принципами, сформулированными в Директиве 2010/63/ЕС Европейского парламента и Европейского Совета от 22 сентября 2010 года о защите животных, используемых в научных целях (Официальный журнал Европейского союза, 2010 г.) и одобрен этическим комитетом Института иммунологии и физиологии УрО РАН (Протокол № 04/19 от 18.12.2019). Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП ИИФ УрО РАН.

Индукция диабета и экспериментальные группы

Были сформированы следующие экспериментальные группы животных: 1 — интактная, 2 — животные с аллоксановой моделью сахарного диабета 1 типа (СД1), 3 — животные со стрептозотоцин-никотинамидной моделью сахарного диабета 2 типа (СД2). Для создания модели СД1 использовали аллоксан, разведенный в 0,85% растворе хлорида натрия, который вводили внутрибрюшинно в суммарной дозе 170 мг/кг массы тела животного по модифицированной авторской методике [3]. Для моделирования СД2 животным вводили внутрибрюшинно стрептозотоцин, разведенный в цитратном буфере в дозе 65 мг/кг массы тела животного, с предварительным (за 15 минут) внутрибрюшинным введением водного раствора никотинамида в дозе 110 мг/кг массы тела животного [7]. Животных выводили из эксперимента на 30-е сутки после индукции диабета. Перед выведением животные были лишены пищи за 12 часов до эксперимента, доступ к воде оставляли свободным. Предварительно у крыс брали кровь из хвостовой вены для верификации воспроизведения моделей СД.

Анализ крови

В плазме крови крыс определяли содержание инсулина, глюкозы, HbA_{1c} , общего количества белка, а также активность ферментов: аспаратаминотрансферазы или АСТ (К.Ф.2.6.1.1), аланинаминотрансферазы или АЛТ (К.Ф.2.6.1.2), щелочной фосфатазы или ЩФ (К.Ф.3.1.3.1). Для определения биохимических тестов использовали наборы реактивов фирмы «Витал Диагностикс» (Санкт-Петербург). Содержание гликированного гемоглобина (HbA_{1c}) в цельной крови определяли методом аффинной гель-хроматографии с использованием набора ГЛИКОГЕМОТЕСТ («ЭЛТА», Российская Федерация), оптическую плотность измеряли спектрофотометром DU-800 (Beckman, США). Методом иммуноферментного анализа в плазме крови определяли содержание инсулина (набор реактивов Rat/Mouse Insulin ELISA, Millipore, США).

Использовали иммуноферментный анализатор LAZURITE AUTOMATED ELISA SYSTEM (Dynex Technologies, США).

Общий анализ в крови, взятой из хвостовой вены, выполняли на автоматическом гематологическом анализаторе Celly 70 Biocode Hysel, предназначенном для анализа в экспериментах и ветеринарии.

Гистологические и иммуногистохимические исследования

После проведения срединной лапаротомии у животных извлекали печень. Фрагменты ткани фиксировали в 10%-ном водном растворе нейтрального формалина в течение 24 часов. После восьмичасовой промывки материал подвергали стандартной гистологической проводке в автоматизированном тканевом процессоре Leica TP 1020 (Leica Microsystems, Германия). Срезы изготавливали на микротоме Leica SM 2000R (Leica Microsystems, Германия) толщиной 3–4 мкм.

Иммуногистохимическое исследование печени осуществляли на парафиновых срезах. Для оценки экспрессии CD3 применяли первичные антитела Purified Mouse Anti-Rat CD3 клон G 4.18 (BD Pharmingen, США) и CD45 Purified Mouse Anti-Rat CD45 клон OX-1 (BD Pharmingen, США), которые в разведении 1:30 инкубировали в течение 60 минут при комнатной температуре, а затем вторичные антитела Biotin Goat Anti-Mouse Ig (Multiple Adsorption) (BD Biosciences, США) в разведении 1:500. Антигенреактивные клетки выявляли при помощи тест-системы Novolink™ Polymer Detection System (Novocastra Lab., Ltd), контрастируя их хромогенным субстратом (3,3'-диаминобензидин в буферном растворе). DAB-позитивные клетки идентифицировали по коричневому окрашиванию цитоплазмы клеток. Проводили негативный и изотипический контроль, оценивая в срезах количество клеток с различной интенсивностью положительной ИГХ-реакции. Микроскопическое исследование проводили на микроскопе Leica DM 2500 (Leica, Germany) с видеокамерой Leica DFC420, анализ изображений выполняли в программе Leica Application Suite (V4) (Leica, Germany). Количественную оценку $CD3^+$ и $CD45^+$ клеток производили в единице площади в 20 полях зрения при увеличении микроскопа $\times 1000$.

Статистический анализ

Статистический анализ результатов выполнен с использованием программного обеспечения OriginPro 2018 software (OriginLab Corporation, США) и непараметрического критерия Манна–Уитни и Краскела–Уоллиса ($p < 0,05$). Данные представлены в виде среднего $\pm$ ошибки среднего ($M \pm m$).

Результаты

При определении концентрации глюкозы и HbA_{1c} в крови было показано, что у животных с экспериментальными моделями СД1 и СД2 по сравнению с аналогичными показателями интактной группы увеличивается в одинаковой степени концентрация не только глюкозы, но и HbA_{1c} .

Уровень инсулина в группе СД1 снижается по сравнению с показателем здоровых крыс, тогда как у животных с экспериментальным СД2 содержание инсулина остается на уровне показателя интактной группы (табл. 1).

При оценке активности ферментов зафиксировано увеличение активности АЛТ у диабетических крыс относительно нормы, у животных с экспериментальным СД 2 типа увеличение этого показателя было более выражено, чем в группе СД1 (табл. 1). Повышение активности АЛТ у животных с моделью СД2 влечет за собой снижение коэффициента де Ритиса. У животных с аллоксановой моделью СД1 отмечается повышение уровня АСТ относительно показателя интактной группы, тогда как в группе СД2 данный показатель остается на уровне здоровых крыс.

У крыс со стрептозотоцин-никотинамидной моделью СД2 и аллоксановой моделью СД1 не выявлено достоверных изменений активности щелочной фосфатазы относительно значения

показателя здоровых животных (табл. 1). Зафиксировано уменьшение количества общего белка в плазме крови крыс с обеими моделями СД в сравнении с показателем интактной группы; в группе СД1 снижение уровня белка было выражено в большей степени, чем в группе СД2 (табл. 1).

Установлено увеличение как общего количества лейкоцитов, так и фракций лимфоцитов и гранулоцитов в периферической крови крыс с моделью диабета 1 и 2 типа по сравнению с показателями интактных животных (табл. 2). У животных группы СД2 общее количество лейкоцитов и лимфоцитарная фракция увеличились в большей степени, чем в группе СД1. В то же время не изменилось в крови животных в группах СД1 и СД2 содержание средних клеток, включающих преимущественно моноциты, а также некоторое количество базофилов, эозинофилов и незрелых клеток (табл. 2).

Результаты иммуногистохимического исследования показали, что моделирование СД у животных сопровождается увеличением количества $CD45^+$ клеток почти в 2,7 раза как при СД1, так и при СД2. Отмечается увеличение числа данных клеток, расположенных периваскулярно и в паренхиме органа. При СД1 количество $CD45^+$ клеток, локализующихся в паренхиме печени и периваскулярно превышает данный показатель интактной группы в 3,7 и 1,7 раза соответственно. У группы с СД2 число $CD45^+$ клеток, распо-

ТАБЛИЦА 1. БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ В КРОВИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ

TABLE 1. BLOOD BIOCHEMICAL PARAMETERS IN EXPERIMENTAL ANIMALS

Показатель / Группа Parameter / Group	Интактная Intact	СД1 T1DM	СД2 T2DM
Глюкоза, ммоль/л Glucose, mmol/L	5,20±0,40	10,88±0,47*	10,78±0,42*
HbA_{1c} , %	4,07±0,30	6,73±0,78*	6,60±0,20* #
Инсулин, мкг/л Insulin, mkg/L	1,28±0,19	0,50±0,09*	1,00±0,13#
АСТ, мкмоль/мин × л AST, mkmol/min × L	16,5±1,0	21,0±1,0*	16,4±0,8#
АЛТ, мкмоль/мин × л ALT, mkmol/min × L	12,9±0,9	16,3±1,1*	23,1±1,5* #
АСТ/АЛТ AST/ALT	1,29±0,06	1,30±0,06	0,73±0,07* #
ЩФ, мкмоль/мин × л ALP, mkmol/min × L	69,7±3,9	63,4±11,0	65,0±12,5
Общий белок, г/л Total protein, g/L	72,0±2,7	59,1±1,6*	68,6±3,8* #

Примечание. * – различие по сравнению с показателем контроля ($p < 0,05$); #, различие по сравнению с показателем группы СД1 ($p < 0,05$).

Note. * – significant difference with control group ($p < 0.05$); # – significant difference with the T1D group ($p < 0.05$).

ТАБЛИЦА 2. ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ

TABLE 2. HEMATOLOGICAL PARAMETERS OF EXPERIMENTAL ANIMALS

Показатель / Группа Parameter / Group	Интактная Intact	СД1 T1DM	СД2 T2DM
Лейкоциты, тысяч/мкл Leukocytes, thousand/ μ L	7,68 $\pm$ 0,42	11,31 $\pm$ 0,23*	14,54 $\pm$ 1,29* #
Лимфоциты, тысяч/мкл Lymphocytes, thousand/ μ L	4,67 $\pm$ 0,42	5,93 $\pm$ 0,25*	9,33 $\pm$ 0,94* #
Средние клетки, тысяч/мкл Average cells, thousand/ μ L	0,77 $\pm$ 0,23	1,10 $\pm$ 0,11	1,44 $\pm$ 0,22
Гранулоциты, тысяч/мкл Granulocytes, thousand/ μ L	2,25 $\pm$ 0,25	4,28 $\pm$ 0,26*	3,77 $\pm$ 0,40*

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. As for Table 1.

ТАБЛИЦА 3. КОЛИЧЕСТВО СИНУСОИДАЛЬНЫХ КЛЕТОК, МАКРОФАГОВ И ЛИМФОЦИТОВ С РАЗНЫМ ИММУНОФЕНОТИПОМ В ПЕЧЕНИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ

TABLE 3. NUMBER OF SINUSOIDAL CELLS, MACROPHAGES AND LYMPHOCYTES WITH DIFFERENT IMMUNOPHENOTYPES IN THE LIVER OF EXPERIMENTAL ANIMALS

Показатель / Группа Parameter / Group	Интактная Intact	СД1 T1DM	СД2 T2DM
Количество синусоидальных клеток, N/мм ² Sinusoidal cells, N/mm ² liver section	387,1 $\pm$ 14,2	645,2 $\pm$ 34,0*	713,2 $\pm$ 33,5* #
Количество макрофагов, N/мм ² Macrophages, N/mm ² liver section	116,1 $\pm$ 2,2	204,0 $\pm$ 8,3*	213,9 $\pm$ 9,5*
Общее количество CD45 ⁺ клеток, N/мм ² среза печени, % Total number of CD45 ⁺ cells, N/mm ² liver section	27,16 $\pm$ 1,73	72,80 $\pm$ 1,75*	74,10 $\pm$ 2,37*
Количество CD45 ⁺ клеток, расположенных в паренхиме N/мм ² , % CD45 ⁺ cells, located in liver parenchyma, N/mm ² liver section, %	11,83 $\pm$ 1,59 (43,56%)	46,89 $\pm$ 1,51* (64,40%)	42,90 $\pm$ 1,77* # (57,9%)
Количество CD45 ⁺ клеток, расположенных периваскулярно, N/мм ² , % Perivascular located CD45 ⁺ cells, N/mm ² liver section, %	15,33 $\pm$ 2,30 (56,44%)	25,91 $\pm$ 0,70* (35,59%)	31,20 $\pm$ 2,13* # (42,10%)
Общее количество CD3 ⁺ клеток, N/мм ² среза печени Total number of CD3 ⁺ cells, N/mm ² liver section	5,20 $\pm$ 1,16	26,65 $\pm$ 1,15*	42,90 $\pm$ 1,16* #
Количество CD3 ⁺ клеток, расположенных в паренхиме N/мм ² , % CD3 ⁺ cells, located in liver parenchyma, N/mm ² liver section, %	1,30 $\pm$ 1,16 (25%)	12,35 $\pm$ 1,32* (46,34%)	19,50 $\pm$ 1,12* # (45,45%)
Количество CD3 ⁺ клеток, расположенных периваскулярно, N/мм ² , % Perivascular located CD3 ⁺ cells, N/mm ² liver section, %	3,90 $\pm$ 1,83 (75%)	14,30 $\pm$ 1,68* (53,66%)	23,40 $\pm$ 1,42* # (54,54%)

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. As for Table 1.

ложенных вокруг сосудов и в паренхиме органа выше в 3,6 и 2 раза по сравнению с аналогичными показателями здоровых крыс (табл. 3).

При подсчете $CD3^+$ клеток на фоне моделирования СД 1 и 2 типа установлено увеличение их количества по сравнению со значением интактной группы. Так, при СД1 количество $CD3^+$ клеток, расположенных в паренхиме печени и периваскулярно, выше данного показателя интактной группы в 9,5 и 3,6 раза соответственно. В печени животных с СД 2 типа число $CD3^+$ клеток, локализованных в паренхиме печени и вокруг сосудов, больше аналогичного показателя здоровых животных в 15 и 8,2 раза соответственно (табл. 3).

Обсуждение

Повышение в крови уровня глюкозы и HbA1c подтверждает развитие СД у экспериментальных животных, а накопление гликированного гемоглобина свидетельствует о состоянии гипергликемии в течение не менее чем четырех недель [1]. Несмотря на сходное увеличение содержания глюкозы и HbA1c, многие исследованные параметры отличаются в группах крыс с диабетом 1 и 2 типа. Так, полученное различие в содержании инсулина соответствует моделированию СД1 и СД2.

Установленное в эксперименте возрастание активности АЛТ у животных с моделированием диабета 1 и 2 типа подтверждается данными литературы, которые свидетельствуют об ассоциации повышенной активности АЛТ с развитием СД [20], а снижение коэффициента де Ритиса является маркером повреждения и некроза гепатоцитов [4]. Более выраженное увеличение активности АЛТ и уменьшение коэффициента де Ритиса в группе СД2 может быть ассоциировано с гибелью большего количества гепатоцитов, чем в группе СД1. Повышение активности АСТ обнаружено только у животных с аллоксановой моделью диабета, может отражать изменения проницаемости мембран не только гепатоцитов, но также кардиомиоцитов и других клеток.

Отсутствие изменения активности щелочной фосфатазы в обеих группах диабетических крыс исключает развитие холестатического синдрома.

Более выраженная гипопроотеинемия у крыс с экспериментальным СД1 по сравнению группой СД2 указывает на более значительное нарушение белоксинтетической функции печени у животных при моделировании СД1.

Более выраженная гипопроотеинемия у крыс с экспериментальным СД1 по сравнению группой СД2 указывает на более значительное нарушение белоксинтетической функции печени у животных при моделировании СД1.

Увеличение общего количества лейкоцитов, лимфоцитарной и гранулоцитарной фракций в периферической крови диабетических крыс свидетельствует об активации неспецифических и специфических иммунных реакций, обуславливающих аутоиммунную агрессию и воспалительный процесс в печени и других органах [13].

Воспалительный процесс, вероятно, более выражен в печени крыс группы СД2, что согласуется с обнаруженной более высокой активностью АЛТ в этой группе по сравнению с СД1. Отсутствие достоверных изменений фракции средних клеток в крови может быть связано с переходом в поджелудочную железу, печень и другие органы значительной части моноцитов, дифференцирующихся в органах в макрофаги. Так, увеличение количества синусоидальных клеток, содержащих не менее 40% макрофагов, было установлено в эксперименте с моделированием аллоксанового диабета 1 типа [2], а также было выявлено увеличение инфильтрации печени макрофагами у мышей с СД2, полученным в результате жировой диеты [19].

Известно, что в повреждении печени участвуют все синусоидальные клетки, включающие эндотелиальные клетки, клетки Купфера, звездчатые и ямочные клетки, но ведущая роль принадлежит Купферовским клеткам (резидентным макрофагам), которые активно фагоцитируют апоптотические гепатоциты и фрагменты разрушенных клеток, презентуют аутоантигены, вырабатывают активные формы кислорода, провоспалительные цитокины и хемоаттрактанты, привлекающие лейкоциты крови. Активация резидентных макрофагов сопровождается поступлением в печень полиморфноядерных лейкоцитов, Т-лимфоцитов и мононуклеаров. Последние дифференцируются в макрофаги, которые могут усугублять деструкцию или способствовать восстановительному росту в зависимости от их фенотипа. Увеличение количества синусоидальных клеток происходит за счет инфильтрации печени лейкоцитами, имеющими общий антиген $CD45^+$.

Согласно данным литературы, гипергликемия приводит к развитию низкоинтенсивного системного хронического воспаления [9, 13]. Проведенное исследование лейкоцитов периферической крови диабетических крыс свидетельствует о воспалительном процессе на уровне всего организма, а иммуногистохимическое исследование печени показало наличие воспалительного процесса в печени, так как при моделировании СД 1 и 2 типа в печени животных резко возрастает количество $CD45^+$ клеток — различных фракций лейкоцитов. Увеличенное абсолютное и относительное количество данных клеток обнаруживается как периваскулярно, так и в паренхиме

органа, что отражает экссудативную фазу воспаления. При моделировании СД 1 типа накопление CD45⁺ клеток несколько более выражено в паренхиме печени, чем вокруг сосудов, в отличие от печени крыс с СД2, где наблюдается обратное соотношение. Вместе с тем, у групп с СД1 и СД2 увеличивается количество CD3⁺ клеток, локализованных вокруг сосудов и в паренхиме органа, что характеризует наличие воспалительной реакции в органе, опосредованной Т-лимфоцитами, проявляющимися цитотоксичность.

В группе СД2 общее количество синусоидальных клеток и количество CD3⁺ клеток в целом и расположенных в паренхиме и периваскулярно превышает показатели группы СД1. Более существенная инфильтрация CD3⁺ лейкоцитами печени крыс с моделью СД2 соответствует большему количеству лейкоцитов и лимфоцитов в периферической крови и большей степени выраженности цитолитического синдрома, подтвержденного повышением активности АЛТ и снижением коэффициента де Ритиса.

Заключение

1. Моделирование сахарного диабета 1 и 2 типа с равной степенью гипергликемии сопровождается развитием воспалительного процесса на уровне целого организма и местного воспалительного процесса в ткани печени, более выраженного при моделировании СД2.

2. При моделировании обоих типов СД воспалительная реакция в ткани печени сопровождается резким увеличением количества CD45⁺ клеток, в большем количестве обнаруженных в паренхиме печени животных СД1 и вокруг сосудов в печени животных СД2.

3. Большее количество синусоидальных клеток и более значительная инфильтрация CD3⁺ лейкоцитами печени крыс с моделью СД2 соответствует большему количеству лейкоцитов и лимфоцитов в периферической крови и большей степени выраженности цитолитического синдрома в этой группе.

Список литературы / References

1. Балаболкин М.И., Клебанова Е.М., Кремская В.М. Лечение сахарного диабета и его осложнений (руководство для врачей). М.: Медицина, 2005. 512 с. [Balabolkin M.I., Klebanova E.M., Kreminskaya V.M. Treatment of diabetes mellitus and its complications (a guide for doctors)]. Moscow: Meditsina, 2005. 512 p.
2. Данилова И.Г., Блинкова Н.Б., Гетте И.Ф., Пьянкова З.А., Белоусова А.В., Абидов М.Т. Влияние активации макрофагов на морфофункциональное состояние тучных клеток печени крыс с аллоксановым диабетом // Российский иммунологический журнал, 2016. Т. 10 (19), № 3. С. 244-246. [Danilova I.G., Blinkova N.B., Gette I.F., Pyankova Z.A., Belousova A.V., Abidov M.T. The effect of macrophage activation on the morphofunctional state of liver mast cells in rats with alloxan diabetes. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2016, Vol. 10 (19), no. 3, pp. 244-246. (In Russ.)]
3. Данилова И.Г., Гетте И.Ф. Способ моделирования аллоксанового диабета. Патент на изобретение № 2534411; 2014. [Danilova I.G., Gette I.F. Method for modeling alloxan diabetes. Patent RF. No. 2534411; 2014].
4. Журавлева Л.В., Огнева Е.В. Инсулиноподобный фактор роста-1, цитолиз и холестаз у больных неалкогольной жировой болезнью печени и при ее сочетании с сахарным диабетом 2-го типа // Клиницист, 2013. Т. 3, № 4. С. 48-52. [Zhuravleva L.V., Ogneva E.V. Insulin-like growth factor-1, cytolysis and cholestasis in patients with non-alcoholic fatty liver disease and in its combination with type 2 diabetes mellitus. *Klinitsist = Clinician*, 2013, Vol. 3, no. 4, pp. 48-52. (In Russ.)]
5. Калмыкова З.А., Кононенко И.В., Майоров А.Ю. Сахарный диабет и хронические заболевания печени. Часть 1: общие механизмы этиологии и патогенеза // Терапевтический архив, 2019. Т. 91, № 10. С. 106-111. [Kalmykova Z.A., Kononenko I.V., Mayorov A.Yu. Diabetes mellitus and chronic liver disease. Part 1: general mechanisms of etiology and pathogenesis. *Terapevticheskiy arkhiv = Therapeutic Archive*, 2019, Vol. 91, no. 10, pp. 106-111. (In Russ.)]
6. Петунина Н.А., Тельнова М.Э. Неалкогольная жировая болезнь печени при сахарном диабете 2-го типа // Медицинский совет, 2016. № 4. С. 92-95. [Petunina N.A., Telnova M.E. Non-alcoholic fatty liver disease in type 2 diabetes mellitus. *Meditsinskiy sovet = Medical Council*, 2016, no. 4, pp. 92-95. (In Russ.)]
7. Спассов А.А., Воронкова М.П., Сингур Г.Л., Чепляева Н.И., Чепурнова М.В. Экспериментальная модель сахарного диабета типа 2 // Биомедицина, 2011. № 3. С. 12-18. [Spasov A.A., Voronkova M.P., Singur G.L., Cheplyaeva N.I., Chepurnova M.V. Experimental model of diabetes mellitus type 2. *Biomeditsina = Biomedicine*, 2011, no. 3, pp. 12-18. (In Russ.)]
8. Шаронова Л.А., Вербовой А.Ф., Вербовая Н.И., Пашенцева А.В. Взаимосвязь неалкогольной жировой болезни печени и сахарного диабета 2-го типа // Русский медицинский журнал, 2017. № 22. С. 1635-1640. [Sharonova L.A., Verbovoy A.F., Verbovaya N.I., Pashentseva A.V. The relationship of non-alcoholic fatty liver disease and type 2 diabetes mellitus. *Russkiy meditsinskiy zhurnal = Russian Medical Journal*, 2017, no. 22, pp. 1635-1640. (In Russ.)]

9. Bianchi E., Ripandelli G., Taurone S., Feher J., Plateroti R., Kovacs I., Magliulo G., Orlando M.P., Micera A., Battaglione E., Artico M. Age and diabetes related changes of the retinal capillaries: An ultrastructural and immunohistochemical study. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.*, 2016, Vol. 29, no. 1, pp. 40-53.
10. Celik S., Erdogan S., Tuzcu M., Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) exhibits significant potential as an antidiabetic and liver-protective agent in streptozotocin-induced diabetic rats. *J. Pharmacol. Res.*, 2009, Vol. 60, no. 4, pp. 270-276.
11. Cusi K., Sanyal A.J., Shuyu Zhang S., Hartman M.L., Bue-Valleskey J.M., Hoogwerf B.J., Haupt A. Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) prevalence and its metabolic associations in patients with type 1 diabetes and type 2 diabetes. *J. Diabetes Obes. Metab.*, 2017, Vol 19, no. 11, pp. 1630-1634.
12. Haidara M.A., Dallak M., El Karib A.O., Abd Ellatif M., Eid R.A., Heidar E.H.A., Al-Ani B. Insulin protects against hepatocyte ultrastructural damage induced by type 1 diabetes mellitus in rats. *J. Ultrastruct. Pathol.*, 2018, Vol. 42, no. 6, pp. 508-515.
13. Kahraman N.K., Kahraman C., Koçak F.E., Coşgun S., Şanal B., Korkmaz M., Bayhan Z., Zeren S. Predictive value of neutrophil to lymphocyte ratio in the severity of non-alcoholic fatty liver disease among type 2 diabetes patients. *J. Acta Gastroenterol. Belg.*, 2016, Vol. 79, no. 3, pp. 295-300.
14. Koyama Y., Brenner D. Liver inflammation and fibrosis. *J. Clin. Invest.*, 2017, Vol. 127, no. 1, pp. 55-64.
15. Masarone M., Rosato V., Aglitti A., Bucci T., Caruso R., Salvatore T., Sasso F.C., Tripodi M.F., Persico M. Liver biopsy in type 2 diabetes mellitus: Steatohepatitis represents the sole feature of liver damage. *PLoS One*, 2017, Vol. 12, no. 6, e0178473. doi: 10.1371/journal.pone.0178473.
16. Mendes-Braz M., Martins J.O. Diabetes mellitus and liver surgery: the effect of diabetes on oxidative stress and inflammation. *Mediators Inflamm.*, 2018, Vol. 2018, pp. 1-11.
17. Robinson M.W., Harmon C., O'Farrelly C. Liver immunology and its role in inflammation and homeostasis. *J. Cell. Mol. Immunol.*, 2016, Vol. 13, no. 3, pp. 267-276.
18. Rodríguez V., Plavnik L., Talamoni N.T. Naringin attenuates liver damage in streptozotocin-induced diabetic rats. *Biomed. Pharmacother.*, 2018, Vol. 105, pp. 95-102.
19. Romero-Zerbo S.Y., García-Fernández M., Espinosa-Jiménez V., Pozo-Morales M., Escamilla-Sánchez A., Sánchez-Salido L., Lara E., Cobo-Vuilleumier N., Rafacho A., Oliveira G., Rojo-Martínez G., Gauthier B.R., González-Mariscal I., Bermúdez-Silva F.J. The atypical cannabinoid abn-CBD reduces inflammation and protects liver, pancreas, and adipose tissue in a mouse model of prediabetes and non-alcoholic fatty liver disease. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*, 2020, Vol. 11, no. 103, pp. 1-16.
20. Sheweita S.A., Mashaly S., Newairy A.A., Abdou H.M., Eweda S.M. Changes in oxidative stress and antioxidant enzyme activities in streptozotocin-induced diabetes mellitus in rats: role of alhagi maurorum extracts. *Oxid. Med. Cell. Longev.*, 2016, Vol. 2016, 5264064. doi: 10.1155/2016/5264064.
21. Sanchez-Valle V., Chavez-Tapia N.C., Uribe M., Mendez-Sanchez N. Role of oxidative stress and molecular changes in liver fibrosis: a review. *Curr. Med. Chem.*, 2012, Vol. 19, no. 28, pp. 4850-4860.
22. Shan Z., Cynthia J.C. Hepatic Macrophages in Liver Injury. *Front. Immunol.*, 2020, Vol. 17, no. 11, 322. doi: 10.3389/fimmu.2020.00322.
23. Sviklāne L., Olmane E., Dzērve Z., Kupčs K., Pīrāgs V., Sokolovska J. Fatty liver index and hepatic steatosis index for prediction of non-alcoholic fatty liver disease in type 1 diabetes. *J. Gastroenterol. Hepatol.*, 2018, Vol. 33, no. 1, pp. 270-276.
24. van Herck M.A., Weyler J., Kwanten W.J., Dirinck E.L., De Winter B.Y., Francque S.M., Vonghia L. The differential roles of T cells in non-alcoholic fatty liver disease and obesity. *Front. Immunol.*, 2019, Vol. 6, no. 10, 82. doi: 10.3389/fimmu.2019.00082.

Авторы:

Байкенова М.Б. — младший научный сотрудник ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук; аспирант ФГАОУ ВО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина», г. Екатеринбург, Россия

Соколова К.В. — младший научный сотрудник ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук, г. Екатеринбург, Россия

Authors:

Baykenova M.B., Junior Research Associate, Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Science; Postgraduate Student, B. Yeltsin Ural Federal University, Yekaterinburg, Russian Federation

Sokolova K.V., Junior Research Associate, Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Science, Yekaterinburg, Russian Federation

Гетте И.Ф. — к.б.н., старший научный сотрудник
ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии»
Уральского отделения Российской академии наук,
г. Екатеринбург, Россия

Данилова И.Г. — д.б.н., доцент, заведующая
лабораторией морфологии и биохимии ФГБУН
«Институт иммунологии и физиологии» Уральского
отделения Российской академии наук, г. Екатеринбург,
Россия

Gette I.F., PhD (Biology), Senior Research Associate,
Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian
Academy of Science, Yekaterinburg, Russian Federation

Danilova I.G., PhD, MD (Biology), Associate Professor, Head,
Laboratory of Morphology and Biochemistry, Institute of
Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy
of Science, Yekaterinburg, Russian Federation

Поступила 31.05.2021
Принята к печати 07.11.2021

Received 31.05.2021
Accepted 07.11.2021

УРОВЕНЬ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ *FOXP3*, *IL2R*, *CD8A*, *RORγ* В ЛЕЙКОЦИТАХ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ЗДОРОВЫХ ЛЮДЕЙ И ПАЦИЕНТОВ С АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИЕЙ

Топчиева Л.В.¹, Корнева В.А.², Малышева И.Е.¹

¹ Институт биологии — обособленное подразделение ФГБУН «Федеральный исследовательский центр “Карельский научный центр Российской академии наук”», г. Петрозаводск, Республика Карелия, Россия

² ФГБОУ ВО «Петрозаводский государственный университет», г. Петрозаводск, Республика Карелия, Россия

Резюме. Нарушение баланса Т-регуляторных и Т-эффекторных лимфоцитов рассматривается в последнее время как важное патогенетическое звено артериальной гипертензии (АГ). Однако данные литературы относительно количества этих клеток у пациентов с АГ или у экспериментальных животных с разными моделями индуцированной гипертензии противоречивые. Основные сведения об изменении паттерна иммунных клеток при сердечно-сосудистых заболеваниях получены с использованием проточной цитометрии. В литературе встречаются также данные об экспрессии у больных с патологиями сердечно-сосудистой системы генов, кодирующих поверхностные и цитоплазматические дифференцировочные антигены иммунных клеток, которые совпадают с результатами исследований, полученных с помощью проточной цитометрии. Цель исследования: анализ уровня транскриптов генов, кодирующих маркеры дифференцировки регуляторных (*FOXP3*, *IL2R*) и эффекторных Т-лимфоцитов (Т-хелперов 17 (*RORγ*) и CD8 лимфоцитов (*CD8A*) у здоровых людей и пациентов с артериальной гипертензией (I–II стадии). Обследованы здоровые индивиды (40 человек, 20 мужчин и 20 женщин), пациенты с АГ, не принимавшие гипотензивные препараты (27 человек, 14 мужчин и 13 женщин), пациенты с АГ, принимающие блокаторы β-адренорецепторов (метопролол или бисопролол) (26 человек, 12 мужчин и 14 женщин). Относительный уровень транскриптов в лейкоцитах периферической крови оценивали методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени. Показано, что транскрипционная активность *FOXP3*, *IL2R*, *RORγ* и *CD8A* генов в лейкоцитах периферической крови больных людей существенно выше, чем у здоровых индивидов ($p < 0,01$). Это, вероятно, свидетельствует о повышении у гипертоников количества циркулирующих Т-регуляторных лимфоцитов, CD8⁺ клеток и Т-хелперов 17 и активации у них Т-клеточного иммунитета. Статистически значимых различий в содержании мРНК генов *FOXP3*, *IL2R*, *RORγ* и *CD8A* в лейкоцитах периферической крови мужчин и женщин, как в группе здоровых людей, так и группе пациентов с АГ не выявлено. На фоне приема кардиоселективных блокаторов β-адренорецепторов (метопролола и бисопролола) у гипер-

Адрес для переписки:

Топчиева Людмила Владимировна
Институт биологии — обособленное подразделение
ФГБУН «Федеральный исследовательский центр
“Карельский научный центр Российской академии наук”»
185910, Россия, Республика Карелия, г. Петрозаводск,
ул. Пушкинская, 11.
Тел./факс: 8 (814) 76-98-10.
E-mail: topchieva67@mail.ru

Address for correspondence:

Topchieva Ludmila V.
Institute of Biology, Karelian Research Centre, Russian
Academy of Sciences
185910, Russian Federation, Republic of Karelia,
Pushkinskaya str., 11.
Phone/fax: 7 (814) 76-98-10.
E-mail: topchieva67@mail.ru

Образец цитирования:

Л.В. Топчиева, В.А. Корнева, И.Е. Малышева
«Уровень экспрессии генов *FOXP3*, *IL2R*, *CD8A*,
RORγ в лейкоцитах периферической крови здоровых
людей и пациентов с артериальной гипертензией» //
Медицинская иммунология, 2022. Т. 24, № 2.
С. 273–282. doi: 10.15789/1563-0625-FIC-2385
© Топчиева Л.В. и соавт., 2022

For citation:

L.V. Topchieva, V.A. Korneva, I.E. Malysheva “*FOXP3*,
IL2R, *CD8A* and *RORγ* gene expression in peripheral blood
leukocytes of healthy people and patients with arterial
hypertension”, *Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya
Immunologiya*, 2022, Vol. 24, no. 2, pp. 273–282.
doi: 10.15789/1563-0625-FIC-2385
DOI: 10.15789/1563-0625-FIC-2385

тоники наблюдался более низкий уровень экспрессии указанных генов, что, вероятно, указывает на противовоспалительные и иммуномодулирующие свойства этих препаратов.

Ключевые слова: артериальная гипертензия, адаптивный иммунитет, Т-регуляторные лимфоциты, Т-эффекторные лимфоциты, экспрессия генов, кардиоселективные блокаторы β-адренорецепторов

FOXP3, IL2R, CD8A AND RORγ GENE EXPRESSION IN PERIPHERAL BLOOD LEUKOCYTES OF HEALTHY PEOPLE AND PATIENTS WITH ARTERIAL HYPERTENSION

Topchieva L.V.^a, Korneva V.A.^b, Malysheva I.E.^a

^a Institute of Biology, Karelian Research Centre, Russian Academy of Sciences, Petrozavodsk, Republic of Karelia, Russian Federation

^b Petrozavodsk State University, Petrozavodsk, Republic of Karelia, Russian Federation

Abstract. Impaired balance of T regulatory and T effector lymphocytes has recently been considered as an important pathogenetic link in arterial hypertension (AH). There are, however, contradictory literature data about contents of these cells in the patients with hypertension, or obtained in experimental animal models of induced hypertension. Most results about changed patterns of immune cells in cardiovascular diseases were obtained by means of flow cytometry. There are also some works on expression of genes encoding surface and cytoplasmic differentiation antigens of immune cells in the patients with cardiovascular pathologies. These results coincide with the data obtained with flow cytometric techniques. Purpose of the present study was to analyze of the levels of gene transcripts encoding differentiation markers of regulatory (*FOXP3*, *IL2R*) T cells, effector T subpopulations (T helpers 17 (*RORγ*), and CD8 lymphocytes (*CD8A*) in healthy subjects and the patients with arterial hypertension (stages I-II). We examined healthy individuals (40 people, 20 men and 20 women), 27 patients with hypertension who did not receive antihypertensive therapy (14 men and 13 women), 26 hypertensive patients taking β-adrenergic receptor blockers (metoprolol or bisoprolol), including 12 men and 14 women. The relative levels of transcripts in peripheral blood leukocytes were assessed by real-time RT-PCR. It was shown that the transcriptional activity of *FOXP3*, *IL2R*, *RORγ*, and *CD8A* genes in peripheral blood leukocytes of the diseased people was significantly higher than in healthy individuals ($p < 0.01$). This finding may indicate an increased number of circulating T regulatory lymphocytes, CD8⁺ cells and T helpers 17 in hypertensive patients, and activation of T cell immunity in these patients. There were no statistically significant gender differences in *FOXP3*, *IL2R*, *RORγ* and *CD8A* gene expression in leukocytes, both in the group of healthy people and in hypertensive patients. The patients receiving cardioselective β-adrenergic receptor blockers (metoprolol and bisoprolol) exhibited lower expression of these genes, thus, probably, indicating anti-inflammatory and immunomodulatory properties of these drugs.

Keywords: arterial hypertension, adaptive immunity, T regulatory lymphocytes, T effector lymphocytes, gene expression, β-adrenergic receptor blockers, cardioselective

Введение

В патогенезе артериальной гипертензии (АГ) существенную роль играет воспаление, реализуемое через активацию клеток врожденного и приобретенного (адаптивного) иммунитета [7, 28]. Важные компоненты последнего — многочисленные типы Т-клеток, которые на основании профиля продукции цитокинов и экспрессии специфических факторов транскрипции

классифицируются на четыре основных подгруппы: Th1, Th2, Th17 и регуляторные Т-клетки (Treg) [38]. Выдвигается предположение, что дисрегуляция иммунного ответа является одним из ключевых факторов формирования АГ [31, 34]. У пациентов с АГ наблюдается увеличение пула провоспалительных Т-хелперов (Th1) и снижение количества противовоспалительных Th2 [17]. В развитии иммунного ответа играют

роль не только эффекторные, но и регуляторные Т-лимфоциты (Treg), или иначе, Т-супрессоры, контролирующие численность и активность Т-хелперов и Т-киллеров [2]. Молекулярным маркером этих клеток считается экспрессия гена транскрипционного фактора FoxP3 (Forkhead Box P3). Данные, полученные в экспериментах на животных с различными моделями гипертензии, и результаты исследований пациентов с патологиями сердечно-сосудистой системы, свидетельствуют о том, что при этих заболеваниях нарушается баланс CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ регуляторных клеток и общего числа Т-лимфоцитов, что может негативно сказываться на супрессии иммунного ответа [28]. В развитии гипертензии существенную роль играют Т-хелперы 17 (Th17), подтип CD4⁺Т-клеток, характеризующийся продуцированием провоспалительного цитокина интерлейкина-17 [14]. Снижение соотношения Т-регуляторных лимфоцитов и Th17 характерно для пациентов с АГ [17], острым коронарным синдромом [25], атеросклеротическим повреждением сосудов [26]. В развитии воспаления при формировании стабильно высокого давления крови, вероятно, играют роль и другие Т-клетки. Так, АГ сопровождается повышением процента цитотоксических CD8⁺Т-клеток, продуцирующих провоспалительные цитокины IFN γ и TNF α [28]. Тем не менее, вопрос, как изменяется пул Treg-, Th17- и CD8⁺ клеток при АГ, остается открытым. Например, в работе Ji и соавт. показано, что у лиц с повышенным давлением крови увеличено количество Th17 [17]. В то же время в другом исследовании значимых различий в количестве этих клеток у пациентов с артериальной гипертензией и нормотоников не обнаружено [11]. Данные о количестве Т-регуляторных лимфоцитов у пациентов с артериальной гипертензией и экспрессии у них и экспериментальных животных гена *FOXP3* также неоднозначные. В одних случаях при гипертензии отмечено снижение количества Treg-клеток [17, 18], в других — отсутствие значимых различий этого показателя у здоровых людей и гипертоников [3, 11]. Известно, что некоторые препараты, используемые для лечения кардиоваскулярных расстройств, обладают противовоспалительными свойствами. Например, применение статинов способствует не только нормализации липидного спектра больных сердечно-сосудистыми заболеваниями, но и снижению активности NLRP3 инфламасомы и продукции провоспалительных цитокинов IL-1 β и IL-18 [23]. Эти лекарственные средства, а также гипотензивные препараты (например кардиосе-

лективные блокаторы β -адренорецепторов) способствуют повышению пула Treg-клеток [26] и снижению содержания IL-17 в плазме крови [17]. Тем не менее, данные о влиянии гипотензивной терапии на баланс Treg-клеток, Th17 и CD8⁺Т-клеток при АГ еще малочисленны. Важнейшей характеристикой Treg-клеток является экспрессия гена *FOXP3* и альфа субъединицы рецептора к цитокину IL-2 (CD25), а Th17 — гена транскрипционного фактора *ROR γ* (RETINOIC ACID-RELATED ORPHAN RECEPTOR GAMMA). Маркером дифференцировки цитотоксических CD8⁺ лимфоцитов является присутствие на поверхности этих клеток гликопротеина, облегчающего распознавание клеточно-связанных антигенов основного комплекса гистосовместимости класса I. *CD8A*-ген кодирует альфа-цепь этого белка.

Цель исследования — анализ уровня экспрессии генов *FOXP3*, *ROR γ* , *CD8A*, *IL2R* в лейкоцитах периферической крови (ЛПК) здоровых доноров и пациентов с артериальной гипертензией (I-II стадии).

Материалы и методы

В исследование включены 40 здоровых индивидов (возраст 45 $\pm$ 4,3 лет), 27 пациентов с АГ, не принимавшие гипотензивные препараты (возраст 42 $\pm$ 5,2 года), 26 пациентов с АГ, принимающие блокаторы β -адренорецепторов (метопролол (25 мг/сут) или бисопролол (5-10 мг/сут) (возраст 50 $\pm$ 3,8 лет). Средний возраст обследованных лиц во всех группах значимо не различался ($p > 0,05$). Поскольку препараты, способствующие снижению артериального давления различаются по механизму действия, в группу пациентов, находящихся на терапии были включены лица принимающие только блокаторы β -адренорецепторов. Продолжительность приема препаратов — более 1 года. Подгруппа здоровых обследована при прохождении диспансеризации на базе ГБУЗ «Больница скорой медицинской помощи г. Петрозаводска». Диагноз «АГ» установлен с учетом европейских рекомендаций по АГ 2018 г. [39].

Критерии исключения из исследования: наличие сахарного диабета, перенесенные в последний месяц инфекционно-воспалительные заболевания, курение табака, алкогольная зависимость, индекс массы тела ≥ 28 кг/м². Индекс массы тела составил в среднем 25,28 $\pm$ 0,53. Все доноры являлись жителями Республики Карелия. На проведение исследований получено согласие Комитета по медицинской этике Минздрава Республики Карелия и ПетрГУ.

ТАБЛИЦА 1. ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ ПРАЙМЕРОВ ДЛЯ ПЦР В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ

TABLE 1. REAL-TIME PCR PRIMER SEQUENCE

Ген Gene	Последовательность праймера 5'....3' Primer sequence 5'....3'		Размер ПЦР продукта, п.о. PCR product size, bp	Источник Source
	Прямой Forward	Обратный Reverse		
<i>FOXP3</i>	GCCACAACCTGAGTCTGC	GTTCTGTCATCCTCCTTTCC	172	[15]
<i>CD8A</i>	CACCTTCCTCCTATACCTCTC	GTAGCCCTCGTTCTCTCG	136	Собственный дизайн Own design
<i>IL2RA</i>	CAACTCCTGACTCCGATAG	TGAATCCATCTTCCTGACC	184	Собственный дизайн Own design
<i>RORγ</i>	CCAAGGCAGGGCTCAATG	GAAGTCCACATCGGTCAGG	123	[15]
<i>18S rRNA</i>	AGAAACGGCTACCACATCCA	CACCAGACTTGCCCTCCA	169	[30]
<i>GAPDH</i>	GACAGTCAGCCGCATCTTC	ACTCCGACCTTCACCTTCC	79	Собственный дизайн Own design

ТАБЛИЦА 2. ОТНОСИТЕЛЬНЫЙ УРОВЕНЬ ТРАНСКРИПТОВ ГЕНОВ *FOXP3*, *CD8*, *IL2R*, *RORγ* В ЛПК ЗДОРОВЫХ ЛЮДЕЙ И ПАЦИЕНТОВ С АГ

TABLE 2. RELATIVE LEVEL OF *FOXP3*, *CD8*, *IL2R*, *RORγ* GENES TRANSCRIPTS IN PBL OF HEALTHY PEOPLE AND PATIENTS WITH HYPERTENSION

Ген Gene	Группа Group		
	Здоровые люди Healthy people (n = 40)	АГ без терапии Hypertension without therapy (n = 27)	АГ терапия Hypertension with therapy (n = 26)
<i>FOXP3</i>	0,026±0,004	1,685±0,180*	1,290±0,480*
<i>CD8A</i>	0,023±0,006	5,450±5,780*	0,870±0,038***
<i>IL2R</i>	0,029±0,009	3,600±0,240*	0,098±0,027***
<i>RORγ</i>	0,0070±0,0002	1,070±0,600*	0,088±0,200***

Примечание. * – различия значимы при сравнении с контрольной группой, ** – различия значимы при сравнении с группой АГ без терапии. В скобках представлен объем выборки.

Note. *, differences are significant when compared with the control group; **, differences are significant when compared with the group of hypertension without therapy.

ТАБЛИЦА 3. ОТНОСИТЕЛЬНЫЙ УРОВЕНЬ ТРАНСКРИПТОВ ГЕНОВ *FOXP3*, *CD8*, *IL2R*, *RORγ* В ЛПК МУЖЧИН И ЖЕНЩИН

TABLE 3. RELATIVE LEVEL OF *FOXP3*, *CD8*, *IL2R*, *RORγ* GENES TRANSCRIPTS IN PBL OF MEN AND WOMEN

Ген Gene	Группа Group					
	Мужчины Men			Женщины Women		
	Здоровые Healthy (n = 20)	АГ без терапии Hypertension without therapy (n = 14)	АГ терапия Hypertension with therapy (n = 12)	Здоровые Healthy (n = 20)	АГ без терапии Hypertension without therapy (n = 13)	АГ терапия Hypertension with therapy (n = 14)
<i>FOXP3</i>	0,016±0,007	2,370±0,780*	2,390±0,130*	0,038±0,006	1,110±0,440*	0,180±0,110***
<i>CD8A</i>	0,025±0,005	2,730±0,550*	1,024±0,490***	0,020±0,005	8,1700±0,6200*	0,720±0,060***
<i>IL2R</i>	0,038±0,006	1,810±0,640*	0,057±0,020**	0,031±0,010	5,400±2,160*	0,137±0,047***
<i>RORγ</i>	0,010±0,004	2,010±1,000*	0,062±0,017***	0,003±0,001	0,170±0,045*	0,125±0,090***

Примечание. См. примечание к таблице 2.

Note. As for Table 2.

Тотальную РНК (тотРНК) выделяли из лейкоцитов периферической крови (ЛПК) с помощью реагента PureZole (Bio-Rad, США) и обрабатывали ДНКазой (1 ед. а). Качество тотРНК определяли с помощью электрофореза в 1% агарозном геле. Количество тотРНК оценивали спектрофотометрически (SmartSpecPlus, Bio-Rad, США). Для синтеза первой цепи использовали набор MMLV RT kit (Евроген, Россия). Уровень экспрессии генов *FOXP3*, *CD8A*, *IL2R* и *RORγ* оценивали с помощью ПЦР в режиме реального времени на приборе LightCycler (Roche, Германия). Смесь для ПЦР объемом 25 мкл содержала 50 нг кДНК, по 0,2 мкМ прямого и обратного праймеров, 5 мкл реакционной смеси Screen-Mix SYBR Green (Евроген, Россия) и 16 мкл деионизированной свободной от нуклеаз воды. Протокол ПЦР: денатурация ДНК 5 мин при 95 °С; 40 циклов: денатурация при 95 °С 30 с; отжиг при 60 °С 30 с; элонгация при 72 °С 30 с. Праймеры конструировали в программе BeaconDesigner 5.0. Последовательность праймеров для анализа экспрессии генов представлены в таблице 1. В качестве референсных использовали гены *18S rRNA* и *GAPDH*. Олигонуклеотиды синтезированы в фирме Синтол (Россия). ПЦР повторяли не менее 3 раз. Эффективность ПЦР оценивали с помощью стандартной кривой. Относительный уровень транскриптов рассчитывали по формуле: уровень транскриптов = 2^{-Ct} (референсный) – Ct (тестовый образец), где Ct – значение пороговых циклов.

Статистическую обработку данных проводили в программе Statgraphics 2.1. Для анализа статистической значимости различий уровней транскриптов был использован непараметрический критерий U Вилкоксона–Манна–Уитни. Данные в таблицах представлены в виде среднего значения (M) ± ошибка среднего (m).

Результаты

Уровень транскриптов гена *FOXP3* в ЛПК здоровых людей оказался значительно ниже, чем пациентов с АГ независимо от того, принимали они или не принимали блокаторы β-адренорецепторов ($p < 0,001$) (табл. 2). Уровень мРНК гена *RORγ* в ЛПК пациентов с АГ не получавших метапролол или бисопролол, значительно превышал таковой у здоровых индивидов ($p < 0,01$) (табл. 2). Содержание транскриптов этого гена в ЛПК пациентов с АГ без терапии выше, чем у пациентов с АГ, принимающих блокаторы β-адренорецепторов ($p < 0,01$). Уровень

мРНК генов *CD8A* и *IL2R* в ЛПК здоровых людей и гипертоников был аналогичен уровню транскриптов гена *RORγ* (табл. 2).

Количество транскриптов всех изученных генов в ЛПК мужчин и женщин как из контрольной группы, так и группы пациентов с АГ не отличалось ($p > 0,05$) (табл. 3). Необходимо отметить, что в группе женщин с АГ, принимающих гипотензивные препараты содержание мРНК гена *FOXP3* было ниже, чем у пациенток без соответствующей терапии, тогда как у мужчин этот показатель был практически одинаковым.

Обсуждение

В последнее время возрастает интерес к проблеме участия врожденного и адаптивного иммунитета в патогенезе сердечно-сосудистых заболеваний, в том числе и артериальной гипертензии [7, 38]. Еще в начале 90-х годов прошлого столетия стало известно, что развитие артериальной гипертензии может быть предотвращено иммуносупрессией и, наоборот, индуцироваться после адаптивного переноса лимфоидных клеток от крыс с генетически запрограммированным высоким кровяным давлением к нормотензивным животным [32]. Об активации иммунной системы и важной роли клеток адаптивного иммунитета в поддержании гипертензии свидетельствует ряд фактов. Оказалось, что у гипертоников повышено количество провоспалительных цитотоксических $CD8^+$ Т-клеток и $CD45RO$ клеток памяти по сравнению со здоровыми донорами [16, 29, 41]. Циркулирующие уровни хемокинов СХС типа (регулирующие миграцию нейтрофилов и лимфоцитов в поврежденную ткань) и их рецепторов также были значительно выше у больных с повышенным давлением крови, чем у людей из контрольной группы [41]. При АГ наблюдается повышение соотношения $CD4^+/CD8^+$ лимфоцитов [29, 34]. У гипертоников по сравнению со здоровыми людьми увеличен пул циркулирующих $CD4^+$ Т-клеток, продуцирующих интерлейкин-17, а также $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клеток, которые продуцируют интерферон-γ [16]. Повышение уровня провоспалительных цитокинов в сосудистой сети приводит к ремоделированию сосудов, пролиферацию гладкомышечных клеток и индукцию окислительного стресса [31]. Th17 также продуцируют другие воспалительные цитокины, которые могут играть важную роль при воспалительных заболеваниях, в частности TNFα, известный медиатор воспалительных реакций, а также IL-22 и IL-26.

Об активации Т-клеточного звена адаптивного иммунитета свидетельствуют данные, полученные в нашем исследовании. У пациентов с АГ по сравнению со здоровыми людьми отмечено повышение уровня транскриптов генов, кодирующих маркеры дифференцировки Т-клеток (*FOXP3*, *ROR γ* , *CD8A*, *IL2R*). Повышение транскрипционной активности гена *ROR γ* в ЛПК индивидов со стабильно высоким давлением крови, вероятно, связано с увеличением количества Th17. В поддержании их фенотипа играют роль ряд транскрипционных факторов — STAT3, IRF4 и BATF. Тем не менее отличительной чертой этого типа клеток является экспрессия гена *ROR γ* [35]. Увеличение процента Th17 в периферической крови характерно для гипертоников [17], что, вероятно, связано с их участием в поддержании высокого давления крови. Так, перенос контрольным крысам активированных Th17 от животных, находящихся на диете с высоким потреблением фруктозы или соли, индуцировало у них повышение давления крови [24]. Перенос клеток Th17 от взрослых крыс со спонтанной гипертензией (SHR) молодым SHR донорам ускоряло развитие у них признаков гипертензии [21].

CD8⁺Т-клетки являются основным источником IFN γ . Они накапливаются в почках при гипертензии. Вероятно, повышение количества этих клеток играет роль в патогенезе АГ. Так, у мышей, лишенных CD8⁺Т-клеток, повышение артериального давления в ответ на инфузию ангиотензина II было слабее, чем у животных дикого типа [37]. Следует отметить, что данные относительно изменения числа клеток, экспрессирующих CD8-антиген при АГ не однозначные. Так в работе Трушиной и соавт. выявлено снижение относительного содержания цитотоксических Т-лимфоцитов в периферической крови лиц с АГ и ожирением по сравнению с подобными показателями здоровых индивидов [1]. Снижение количества CD8⁺ клеток в крови пациентов с АГ обнаружено и в исследовании Sereti и соавт. [34]. Этот факт авторы объясняют инфильтрацией CD8⁺Т-лимфоцитов в органы мишени (почки, кровеносные сосуды, селезенку и ткани миокарда). Согласно данным других исследований, у взрослых людей со стабильно высоким давлением крови и у детей с первичной гипертензией наблюдается увеличение числа циркулирующих CD8⁺ клеток [13, 29, 41].

Подмножество CD4⁺Т-клеток экспрессируют транскрипционный фактор FoxP3. Одним из «ранних» маркеров активации лимфоцитов является

увеличение на их поверхности α -цепи рецептора к IL-2 (CD25). Интенсивность экспрессии этого маркера на регуляторных клетках (CD25^{high}) выше, чем в других субпопуляциях Т-лимфоцитов. Поэтому повышение уровня экспрессии гена *FOXP3* и *IL2R*, вероятно, свидетельствует об увеличении количества Treg-клеток при АГ.

АГ сопровождается развитием хронического вялотекущего воспаления. Тем не менее, по данным литературы не совсем понятно, изменяется или нет при этом заболевании количество Т-регуляторных лимфоцитов. Так, оказалось, что у детей с артериальной гипертензией общий пул Treg-клеток в периферической крови значительно меньше, чем у здоровых детей [12]. Также у них отмечено снижение количества CD45RA наивных Treg, общих CD31 Treg. Однако при этом авторы регистрировали повышение числа CD45RA/активированных Treg и зрелых CD45RACD31 [12]. В исследованиях DeCiuceis и соавт. и Agabiti-Rosei, проведенных среди взрослых индивидов с АГ и без нее, различия в количестве CD4⁺CD25⁺Т-клеток между группами не выявлены [3, 11]. Возможно, наличие вялотекущего хронического воспаления определяет повышенную экспрессию гена *FOXP3*, тогда как при острых патологиях сердечно-сосудистой системы, как правило, наблюдается снижение пула Treg-клеток. Например, у пациентов с острым коронарным синдромом количество Treg было ниже, чем у здоровых индивидов [25]. Увеличение содержания транскриптов гена *FOXP3* в ЛПК пациентов с АГ может быть следствием увеличения пула CD8⁺CD25⁺FoxP3⁺Т-клеток. Так, у больных артериальной легочной гипертензией количество этих клеток больше, а CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ значительно меньше, чем у здоровых людей [42]. Снижение пула Treg-лимфоцитов может оказывать негативный эффект на функции сосудов [5]. Увеличение количества Т-регуляторных клеток ассоциировано с ослаблением симптомов гипертензии и признаков повреждения органов-мишеней [10, 40]. Так, адоптивный перенос Treg способствует снижению артериального давления и ослаблению признаков повреждения сердца и почек у экспериментальных животных при ангиотензин-индуцируемой гипертензии [5].

Т-регуляторные клетки представляют субпопуляцию лимфоцитов с противовоспалительной ролью. FoxP3 подавляет функции транскрипционных факторов NFAT (nuclear factor of activated T-cells) и NF- κ B (nuclear factor kappa B), что при-

водит к супрессии транскрипционной активности многих генов, включая *IL2* и генов цитокинов эффекторных Т-клеток [20]. Активность Treg важна для поддержания гомеостаза сердечно-сосудистой системы. Оказалось, что эти клетки инфильтрируются в миокард при ишемической болезни сердца [33]. *In vitro* Т-клетки модулируют фенотип сердечных фибробластов, уменьшают экспрессию актина и металлопротеиназы 3 [33]. Основная функция Т-супрессоров – контролировать силу и продолжительность иммунного ответа через регуляцию функций Т-эффекторных клеток. Еще в работе Ва и соавт. [4] было продемонстрировано, что некоторые клетки иммунной системы при развитии гипертензии могут быть супрессированы. Показано, что прием иммунодепрессантов, например, такролимуса приводит к снижению пула Т-регуляторных клеток ($CD4^+$ /FoxP3⁺), повышению количества $CD4^+$ /IL-17⁺ клеток, эндотелиальной дисфункции и гипертензии [8].

Оказалось, что половая принадлежность влияет как на восприимчивость к гипертензии, так и на профиль Т-клеток при гипертензии [6, 9, 36]. Например, инфузия крысам со спонтанной гипертензией ингибитора лимфоцитов микофенолат мофетила способствовала снижению артериального давления у обоих полов [36]. Однако у самок снижение артериального давления было значительнее, чем у самцов. Кроме этого, количество циркулирующих $CD3^+$, $CD4^+$ и провоспалительных $CD3^+CD4^+ROR\gamma^+Th17$ клеток у самок HSR оказалось больше, а иммуносупрессивных $CD3^+CD4^+FoxP3^+$ Т-регуляторных лимфоцитов, наоборот меньше чем у животных противоположного пола. Также самцы и самки по-разному характеризовались в отношении количества клеток инфильтрированных в почки [36]. На основании полученных результатов авторы заключили, что пол животного влияет на профиль Т-клеток и лимфоциты вносят вклад в поддержание гипертензии у самок SHR. Несколько иные результаты получены в других исследованиях. Прием ацетата дезоксикортикостерона (DOCA) с физиологическим раствором вместо воды вызывал у крыс линии Sprague Dawley повышение артериального давления, причем у самцов в большей степени, чем у самок [6]. Это сопровождалось увеличением количества провоспалительных Т-клеток в почках. У самок число Treg-клеток было выше, чем у самцов. Введение им антител к CD25 нивелировало половые различия в значении артериального давления. По мнению авторов, эти данные

подтверждают гипотезу о том, что Treg-клетки защищают от развития гипертензии и особенно важны для контроля АД у самок. В представленном нами исследовании значимых различий в уровне экспрессии генов, кодирующих специфические антигены Т-лимфоцитов, в ЛПК мужчин и женщин не выявлено. Тем не менее стоит обратить внимание на тот факт, что прием гипотензивных препаратов по-разному оказывал свой эффект в отношении уровня экспрессии гена *FOXP3* у мужчин и женщин. У мужчин с АГ содержание мРНК этого гена в ЛПК было одинаковым, несмотря на то, находились они на гипотензивной терапии или нет. В то же время у женщин прием метопролола или бисопролола, по всей вероятности, способствовал снижению транскрипционной активности гена *FOXP3* и, вероятно, количества экспрессирующих его клеток, в том числе и Treg.

Согласно данным литературы, различные лекарственные препараты, например, статины и кардиоселективные блокаторы β -адренорецепторов способствуют повышению пула Treg-клеток [26] и снижению содержания IL-17 в плазме крови [17]. Таким образом, гипотензивные и гиполипидимические препараты могут оказывать иммуномодулирующий эффект и восстанавливать баланс регуляторных и эффекторных Т-лимфоцитов при АГ. Об этом свидетельствуют и результаты проведенного нами исследования. Так, в ЛПК пациентов, которые принимали кардиоселективные блокаторы β -адренорецепторов уровень транскриптов *ROR\gamma*, *CD8A*, *IL2R* был существенно ниже, чем у пациентов без гипотензивной терапии. Снижение транскрипционной активности гена *FOXP3* на фоне приема лекарств наблюдали только у женщин. Симпатическая нервная система играет важную роль во взаимодействии между мозгом и иммунитетом [27]. Клетки иммунной системы экспрессируют адренорецепторы (АР), активирующиеся под влиянием норадреналина и адреналина. Причем тип и плотность АР определяется свойствами иммунных клеток. Как оказалось, наибольшее количество β -адренорецепторов экспрессируется на поверхности В-лимфоцитов [19]. Среди Т-клеток, наибольшее их количество регистрируется на поверхности Т-супрессоров, а наименьшее – Т-хелперов. Активация β -АР на лимфоцитах может приводить к стимуляции иммунитета [22]. Следовательно, применение блокаторов β -АР способно оказывать противовоспалительное и иммуномодулирующее действие при АГ.

Заключение

Таким образом, в представленной работе выявлен повышенный уровень мРНК генов *FOXP3*, *IL2R*, *CD8A*, *RORγ* в ЛПК пациентов с АГ по сравнению со здоровыми людьми, что свидетельствует об активации иммунного ответа при формировании стабильно высокого давления крови. Применение кардиоселективных блокаторов адренорецепторов, вероятно, способству-

ет снижению уровню транскрипционной активности этих генов и воспалительных процессов при АГ.

Финансирование

Исследования выполнялись в рамках выполнения НИР (№ 0218-2019-0077) ИБ КарНЦ РАН на научном оборудовании (НО) Центра коллективного пользования Федерального исследовательского центра «Карельский научный центр Российской академии наук».

Список литературы / References

1. Трушина Э.Н., Мустафина О.К., Хорхе С.С., Богданов А.Р., Сенцова Т.Б., Залетова Е.С., Кузнецов В.Д. Клеточный иммунитет у больных с артериальной гипертензией и ожирением // Вопросы питания, 2012. № 6. С. 19-26. [Trushina E.N., Mustafina O.K., Jorge S.S., Bogdanov A.R., Sentsova T.B., Zaletova E.S., Kuznetsov V.D. The cell immunity in patients with arterial hypertension and obesity. *Voprosy pitaniya = Problems of Nutrition*, 2012, no. 6, pp. 19-26. (In Russ.)]
2. Фрейдлин И.С. Регуляторные Т-клетки: происхождение и функции // Медицинская иммунология, 2005. Т. 7, № 4. С. 347-354. Freidlin I.S. Regulatory T-cells: origin and function. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2005, Vol. 7, no. 4, pp. 347-354. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2005-4-347-354.
3. Agabiti-Rosei C., Trapletti V., Piantoni S., Airò P., Tincani A., de Ciuceis C., Rossini C., Mittempergher F., Titi A., Portolani N., Caletti S., Coschignano M.A., Porteri E., Tiberio G.A.M., Pileri P., Solaini L., Kumar R., Ministrini S., Agabiti Rosei E., Rizzoni D. Decreased circulating T regulatory lymphocytes in obese patients undergoing bariatric surgery. *PLoS One*, 2018, Vol. 13, no. 5, 0197178. doi: 10.1371/journal.pone.0197178.
4. Ba D., Takeichi N., Kodama T., Kobayashi H. Restoration of T cell depression and suppression of blood pressure in spontaneously hypertensive rats (SHR) by thymus grafts or thymus extracts. *J. Immunol.*, 1982, Vol. 128, no. 3, pp. 1211-1216.
5. Barhoumi T., Kasal D.A., Li M.W., Shbat L., Laurant P., Neves M.F., Paradis P., Schiffrin E.L. T regulatory lymphocytes prevent angiotensin II-induced hypertension and vascular injury. *Hypertension*, 2011, Vol. 57, no. 3, pp. 469-476.
6. Belanger K.M., Crislip G.R., Gillis E.E., Abdelbary M., Musall J.B., Mohamed R., Baban B., Elmarakby A., Brands M.W., Sullivan J.C. Greater T regulatory cells in females attenuate DOCA-salt induced increases in blood pressure versus males. *Hypertension*, 2020, Vol. 75, no. 6, pp. 1615-1623.
7. Caillon A., Paradis P., Schiffrin E.L. Role of immune cells in hypertension. *Br. J. Pharmacol.*, 2019, Vol. 176, no. 12, pp. 1818-1828.
8. Chiasson V.L., Talreja D., Young K.J., Chatterjee P., Banes-Berceli A.K., Mitchell B.M. FK506 binding protein 12 deficiency in endothelial and hematopoietic cells decreases regulatory T cells and causes hypertension. *Hypertension*, 2011, Vol. 57, no. 6, pp. 1167-1175.
9. Crislip G.R., Sullivan J.C. T-cell involvement in sex differences in blood pressure control. *Clin. Sci. (Lond.)*, 2016, Vol. 130, no. 10, pp. 773-783.
10. Crowley S.D., Song Y.S., Lin E.E., Griffiths R., Kim H.S., Ruiz P. Lymphocyte responses exacerbate angiotensin II-dependent hypertension. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 2010, Vol. 298, no. 4, pp. R1089-R1097.
11. de Ciuceis C., Rossini C., Airò P., Scarsi M., Tincani A., Tiberio G.A.M., Piantoni S., Porteri E., Solaini L., Duse S., Semeraro F., Petroboni B., Mori L., Castellano M., Gavazzi A., Agabiti Rosei C., Agabiti Rosei E., Rizzoni D. Relationship between different subpopulations of circulating CD4⁺ T-lymphocytes and microvascular structural alterations in humans. *Am. J. Hypertens.*, 2017, Vol. 30, no. 1, pp. 51-60.
12. Gackowska L., Michałkiewicz J., Helmin-Basa A., Kłosowski M., Niemirska A., Obrycki Ł., Kubiszewska I., Wierzbicka A., Litwin M. Regulatory T-cell subset distribution in children with primary hypertension is associated with hypertension severity and hypertensive target organ damage. *J. Hypertens.*, 2020, Vol. 38, no. 4, pp. 692-700.
13. Gackowska L., Michałkiewicz J., Niemirska A., Helmin-Basa A., Kłosowski M., Kubiszewska I., Obrycki Ł., Szalecki M., Wierzbicka A., Kułaga Z., Wiese M., Litwin M. Loss of CD31 receptor in CD4⁺ and CD8⁺ T-cell subsets in children with primary hypertension is associated with hypertension severity and hypertensive target organ damage. *J. Hypertens.*, 2018, Vol. 36, no. 11, pp. 2148-2156.
14. Harrison D.G., Guzik T.J., Lob H.E., Madhur M.S., Marvar P.J., Thabet S.R., Vinh A., Weyand C.M. Inflammation, Immunity and Hypertension. *Hypertension*, 2011, Vol. 57, no. 2, pp. 132-140.
15. Huang H., Lu Z., Jiang C., Liu J., Wang Y., Xu Z. Imbalance between Th17 and regulatory T-cells in sarcoidosis. *Int. J. Mol. Sci.*, 2013, Vol. 14, no. 11, pp. 21463-21473.
16. Itani H.A., McMaster W.G. Jr., Saleh M.A., Nazarewicz R.R., Mikolajczyk T.P., Kaszuba A.M., Konior A., Prejbisz A., Januszewicz A., Norlander A.E., Chen W., Bonami R.H., Marshall A.F., Poffenberger G., Weyand C.M.,

Madhur M.S., Moore D.J., Harrison D.G., Guzik T.J. Activation of human T cells in hypertension: studies of humanized mice and hypertensive humans. *Hypertension*, 2016, Vol. 68, no. 1, pp. 123-132.

17. Ji Q., Cheng G., Ma N., Huang Y., Lin Y., Zhou Q., Que B., Dong J., Zhou Y., Nie S. Circulating Th1, Th2, and Th17 levels in hypertensive patients. *Dis. Markers*, 2017, Vol. 2017, 7146290. doi: 10.1155/2017/7146290.

18. Katsuki M., Hirooka Y., Kishi T., Sunagawa K. Decreased proportion of Foxp3⁺ CD4⁺ regulatory T cells contributes to the development of hypertension in genetically hypertensive rats. *J. Hypertens.*, 2015, Vol. 33, no. 4, pp. 773-783.

19. Khan M.M., Sansoni P., Silverman E.D., Engleman E.G., Melmon K.L. Beta-adrenergic receptors on human suppressor, helper, and cytolytic lymphocytes. *Biochem. Pharmacol.*, 1986, Vol. 35, no. 7, pp. 1137-1142.

20. Kim C.H. FOXP3 and its role in the immune system. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2009, Vol. 665, pp. 17-29.

21. Kim J.Y., Eunjo L., Koo S., Kim C.-W., Kim I. Transfer of Th17 from adult spontaneous hypertensive rats accelerates development of hypertension in juvenile spontaneous hypertensive rats. *Biomed Res. Int.*, 2021, 6633825. doi: 10.1155/2021/6633825.

22. Kohm A.P., Sanders V.M. Norepinephrine and beta 2-adrenergic receptor stimulation regulate CD4⁺ T and B lymphocyte function *in vitro* and *in vivo*. *Pharmacol. Rev.*, 2001, Vol. 53, no. 4, pp. 487-525.

23. Koushki K., Shahbaz S. K., Mashayekhi K., MahvashSadeghi M., Zayeri Z.D., Taba M.Y., Banach M., Al-Rasadi K., Johnston T.P., Amirhossein Sahebkar A. Anti-inflammatory action of statins in cardiovascular disease: the role of inflammasome and toll-like receptor pathways. *Clin. Rev. Allergy Immun.*, 2020, Vol. 60, no. 2, pp. 175-199.

24. Lee E., Kim N., Kang J., Yoon S., Lee H.A., Jung H., Kim S.H., Kim I. Activated pathogenic Th17 lymphocytes induce hypertension following high-fructose intake in Dahl salt-sensitive but not Dahl salt-resistant rats. *Dis. Model. Mech.*, 2020, Vol. 13, no. 5, dmm044107. doi: 10.1242/dmm.044107.

25. Li Q., Wang Y., Chen K., Zhou Q., Wei W., Wang Y. The role of oxidized low-density lipoprotein in breaking peripheral Th17/Treg balance in patients with acute coronare syndrome. *Biochem. Bioph. Res. Comm.*, 2010, Vol. 394, no. 3, pp. 836-842.

26. Liu Z., Zhao Y., Wei F., Ye L., Lu F., Zhang H., Diao Y., Song H., Qi Z. Treatment with telmisartan/rosuvastatin combination has a beneficial synergistic effect on ameliorating Th17/Treg functional imbalance in hypertensive patients with carotid atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 2014, Vol. 233, no. 291, e299. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2013.12.004.

27. Marino F., Cosentino M. Adrenergic modulation of immune cells: an update. *Amino Acids*, 2013, Vol. 45, no. 1, pp. 55-71.

28. Mikolajczyk T.P., Guzik T.J. Adaptive immunity in hypertension. *Curr. Hypertens. Rep.*, 2019, Vol. 21, no. 9, 68. doi: 10.1007/s11906-019-0971-6.

29. Ni X., Wang A., Zhang L., Shan L.-Y., Zhang H.-C., Li L., Si J.-Q., Luo J., Li X.-Z., Ma K.-T. Up-regulation of gap junction in peripheral blood T lymphocytes contributes to the inflammatory response in essential hypertension. *PLoS One*, 2017, Vol. 12, no. 9, e0184773. doi: 10.1371/journal.pone.0184773.

30. Pinto J.P., Dias V., Zoller H., Porto G., Carmo H., Carvalho F., de Sousa M. Hepcidin messenger RNA expression in human lymphocytes. *Immunology*, 2010, Vol. 130, no. 2, pp. 217-230.

31. Rai A., Narisawa M., Li P., Pia L., li Y., Yang G., Cheng X.W. Adaptive immune disorders in hypertension and heart failure: focusing on T-cell subset activation and clinical implications. *J. Hypertens.*, 2020, Vol. 38, no. 10, pp. 1878-1889.

32. Renaudin C., Bataillard A., Sassard J. Partial transfer of genetic hypertension by lymphoid cells in Lyon rats. *J. Hypertens.*, 1995, Vol. 13, no. 12, Pt 2, pp. 1589-1592.

33. Saxena A., Dobaczewski M., Rai V., Haque Z., Chen W., Li N., Frangogiannis N.G. Regulatory T cells are recruited in the infarcted mouse myocardium and may modulate fibroblast phenotype and function. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 2014, Vol. 307, no. 8, pp. H1233-H1242.

34. Sereti E., Stamatelopoulos K.S., Zakopoulos N.A., Evangelopoulou A., Mavragani C.P., Evangelopoulos M.E. Hypertension: an immune related disorder? *Clin. Immunol.*, 2019, Vol. 212, 108247. doi: 10.1016/j.clim.2019.108247.

35. Tesmer L.A., Lundy S.K., Sarkar S., Fox D.A. Th17 cells in human disease. *Immunol. Rev.*, 2008, Vol. 223, pp. 87-113.

36. Tipton A.J., Baban B., Sullivan J.C. Female spontaneously hypertensive rats have greater renal anti-inflammatory T lymphocyte infiltration than males. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 2012, Vol. 303, no. 4, pp. 359-367.

37. Trott D.W., Thabet S.R., Kirabo A., Saleh M.A., Itani H., Norlander A.E., Wu J., Goldstein A., Arendshorst W.J., Madhur M.S., Chen W., Li C.I., Shyr Y., Harrison D.G. Oligoclonal CD8⁺ T cells play a critical role in the development of hypertension. *Hypertension*, 2014, Vol. 64, no. 5, pp. 1108-1115.

38. Wenzel U., Turner J.E., Krebs C., Kurts C., Harrison D.G., Ehmke H. Immune mechanisms in arterial hypertension. *J. Am. Nephrol.*, 2016, Vol. 27, no. 3, pp. 677-686.

39. Williams B., Mancia G., Spiering W., Agabiti Rosei T., Azizi M., Burnier M., Clement D.L., Coca A., de Simone G., Dominiczak A., Kahan T., Mahfoud F., Redon J., Ruilope L., Zanchetti A., Kerins M., Kjeldsen S.E., Kreutz R., Laurent S., Lip G.Y.H., McManus R., Narkiewicz K., Ruschitzka F., Schmieder R.E., Shlyakhto E., Tsioufis C.,

Aboyans V., Desormais I. Practice Guidelines for the management of arterial hypertension of the European Society of Cardiology and the European Society of Hypertension. *Blood Press.*, 2018, Vol. 27, no. 6, pp. 314-340.

40. Xu L., Chen G., Liang Y., Zhou C., Zhang F., Fan T., Chen X., Zhou H., Yuan W. T helper 17 cell responses induce cardiac hypertrophy and remodeling in essential hypertension. *Pol. Arch. Intern. Med.*, 2021, Vol. 131, no. 3, pp. 257-265.

41. Youn J.-C., Yu H.T., Lim B.J., Koh M.J., Lee J., Chang D.-Y., Choi Y.S., Lee S.-H., Kang S.-M., Jang Y., Yoo O.J., Shin E.-C., Park S. Immunosenescent CD8⁺ T Cells and C-X-C chemokine receptor Type 3 chemokines are increased in human hypertension. *Hypertension*, 2013, Vol. 62, no. 1, pp. 126-133.

42. Zhu R., Chen L., Xiong Y., Wang N., Xie X., Hong Y., Meng Z. An upregulation of CD8⁺CD25⁺Foxp3⁺ cells with suppressive function through interleukin 2 pathway in pulmonary arterial hypertension. *Exp. Cell Res.*, 2017, Vol. 358, no. 2, pp. 182-187.

Авторы:

Топчиева Л.В. — к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории генетики, Институт биологии — обособленное подразделение ФГБУН «Федеральный исследовательский центр «Карельский научный центр Российской академии наук», г. Петрозаводск, Республика Карелия, Россия

Корнева В.А. — к.м.н., доцент кафедры факультетской терапии, фтизиатрии, инфекционных болезней и эпидемиологии, Медицинский институт ФГБОУ ВО «Петрозаводский государственный университет», г. Петрозаводск, Республика Карелия, Россия

Мальшова И.Е. — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории генетики, Институт биологии — обособленное подразделение ФГБУН «Федеральный исследовательский центр «Карельский научный центр Российской академии наук», г. Петрозаводск, Республика Карелия, Россия

Authors:

Topchieva L.V., PhD (Biology), Leading Research Associate, Laboratory of Genetics, Institute of Biology, Karelian Research Centre, Russian Academy of Sciences, Petrozavodsk, Republic of Karelia, Russian Federation

Korneva V.A., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Faculty Therapy, Phthisiology, Infectious Diseases and Epidemiology, Medical Institute, Petrozavodsk State University, Petrozavodsk, Republic of Karelia, Russian Federation

Malysheva I.E., PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Genetics, Institute of Biology, Karelian Research Centre, Russian Academy of Sciences, Petrozavodsk, Republic of Karelia, Russian Federation

Поступила 12.07.2021
Принята к печати 07.11.2021

Received 12.07.2021
Accepted 07.11.2021

ВЗАИМОСВЯЗИ ИММУНОСУПРЕССОРНЫХ НЕЙТРОФИЛОВ И ПОКАЗАТЕЛЕЙ ВРОЖДЕННОГО И АДАПТИВНОГО ИММУНИТЕТА У ПАЦИЕНТОВ С СУБКЛИНИЧЕСКИМ АТЕРОСКЛЕРОЗОМ

Долгушин И.И., Генкель В.В., Батурина И.Л., Савочкина А.Ю.,
Минасова А.А., Никушкина К.В., Пыхова Л.Р., Кузнецова А.С.,
Шапошник И.И.

ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения
РФ, г. Челябинск, Россия

Резюме. Последние пятнадцать лет были отмечены стремительным прогрессом в изучении нейтрофилов. Открытие транскрипционной пластичности нейтрофилов, их фенотипической и функциональной гетерогенности способствовали началу активного междисциплинарного изучения роли нейтрофилов при различных хронических воспалительных заболеваниях. Увеличение в системной циркуляции иммуносупрессорных нейтрофилов может наблюдаться не только при сепсисе, но и при хроническом системном воспалении, которое наряду с нарушениями липидного обмена является важнейшим механизмом развития и прогрессирования атеросклероза. Моноциты, дендритные клетки, Т-лимфоциты и нейтрофилы являются ключевыми участниками и модуляторами воспаления при атеросклерозе. Потенциальное значение иммуносупрессорных нейтрофилов в атерогенезе и регуляции воспалительного ответа при атеросклерозе в настоящее время не установлено. Однако, принимая во внимание их возможные эффекты в отношении Т-лимфоцитов и клеток врожденного иммунитета, изучение иммуносупрессорных нейтрофилов в контексте атеросклероза и атеросклеротических сердечно-сосудистых заболеваний представляется перспективным направлением.

Цель исследования — изучить взаимосвязи между количеством циркулирующих иммуносупрессорных нейтрофилов и субпопуляционным составом Т-лимфоцитов и моноцитов у пациентов с субклиническим атеросклерозом.

В исследование включали пациентов в возрасте 40-64 лет с субклиническим атеросклерозом периферических артерий. Фенотипирование субпопуляций нейтрофилов, лимфоцитов и моноцитов осуществляли методом проточной цитометрии на аппарате Navios 6/2 (Beckman Coulter).

В исследование были включены 133 пациента, 65 (48,8%) мужчин и 68 (51,2%) женщин. По результатам корреляционного анализа было установлено, что увеличение количества циркулирующих CD16^{hi}CD11b^{lo}CD62L^{br} нейтрофилов ассоциировалось с увеличением количества регуляторных

Адрес для переписки:

Генкель Вадим Викторович
ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный
медицинский университет» Министерства
здравоохранения РФ
454092, Россия, г. Челябинск, ул. Воровского, 64.
Тел.: 8 (951) 441-70-61.
E-mail: henkel-07@mail.ru

Address for correspondence:

Genkel Vadim V.
South Ural State Medical University
454092, Russian Federation, Chelyabinsk, Vorovsky str., 64.
Phone: 7 (951) 441-70-61.
E-mail: henkel-07@mail.ru

Образец цитирования:

И.И. Долгушин, В.В. Генкель, И.Л. Батурина,
А.Ю. Савочкина, А.А. Минасова, К.В. Никушкина,
Л.Р. Пыхова, А.С. Кузнецова, И.И. Шапошник
«Взаимосвязи иммуносупрессорных нейтрофилов и
показателей врожденного и адаптивного иммунитета
у пациентов с субклиническим атеросклерозом» //
Медицинская иммунология, 2022. Т. 24, № 2. С. 283-294.
doi: 10.15789/1563-0625-IBI-2463
© Долгушин И.И. и соавт., 2022

For citation:

I.I. Dolgushin, V.V. Genkel, I.L. Baturina, A.Yu. Savochkina,
A.A. Minasova, K.V. Nikushkina, L.R. Pykhova,
A.S. Kuznetsova, I.I. Shaposhnik "Interactions between
immunosuppressor neutrophils, innate and adaptive immunity
indexes in the patients with subclinical atherosclerosis",
Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya,
2022, Vol. 24, no. 2, pp. 283-294.
doi: 10.15789/1563-0625-IBI-2463
DOI: 10.15789/1563-0625-IBI-2463

Т-лимфоцитов. У пациентов с субклиническим атеросклерозом, у которых абсолютное количество циркулирующих иммуносупрессорных нейтрофилов соответствовало первому квартилю (менее 136 кл/мкл), отмечалось статистически значимо меньшее количество регуляторных Т-лимфоцитов в сравнении с пациентами из 2-4 квартиля. Увеличение количества иммуносупрессорных нейтрофилов ассоциировалось с уменьшением количества классических моноцитов, экспрессирующих TLR4 ($r = -0,335$; $p = 0,004$), а также с уменьшением интенсивности экспрессии TLR2 ($r = -0,268$; $p = 0,023$) на неклассических моноцитах. У пациентов с субклиническим атеросклерозом 40-64 лет увеличение количества иммуносупрессорных CD16^{hi}CD11b^{lo}CD62L^{br} нейтрофилов ассоциируется с увеличением содержания регуляторных Т-лимфоцитов и неклассических моноцитов, снижением количества классических моноцитов, экспрессирующих TLR4 и снижением интенсивности экспрессии TLR2 на неклассических моноцитах.

Ключевые слова: врожденный иммунитет, иммуносупрессорные нейтрофилы, адаптивный иммунитет, атеросклероз

INTERACTIONS BETWEEN IMMUNOSUPPRESSOR NEUTROPHILES, INNATE AND ADAPTIVE IMMUNITY INDEXES IN THE PATIENTS WITH SUBCLINICAL ATHEROSCLEROSIS

Dolgushin I.I., Genkel V.V., Baturina I.L., Savochkina A.Yu.,
Minasova A.A., Nikushkina K.V., Pykhova L.R., Kuznetsova A.S.,
Shaposhnik I.I.

South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

Abstract. The last fifteen years have been marked by rapid progress in the study of neutrophils. The discovery of transcriptional plasticity of neutrophils, their phenotypic and functional heterogeneity contributed to launching active interdisciplinary studies on the role of neutrophils in various chronic inflammatory diseases. Increased systemic circulation of immunosuppressive neutrophils can be observed not only in sepsis, but also in chronic systemic inflammation, which, along with disorders of lipid metabolism, is the major mechanism of atherosclerosis development and progression. Monocytes, dendritic cells, T lymphocytes and neutrophils are key participants and modulators of inflammation in atherosclerosis. Potential significance of immunosuppressive neutrophils in atherogenesis and regulation of inflammatory response in atherosclerosis has not been currently established. However, taking into account their possible effects upon T lymphocytes and innate immunity cells, the study of immunosuppressive neutrophils seems promising in the context of atherosclerosis and atherosclerotic cardiovascular diseases. The purpose of this study was to evaluate relationship between the numbers of circulating immunosuppressive neutrophils and subpopulations of T cells and monocytes in the patients with subclinical atherosclerosis.

The study enrolled patients aged 40-64 years with subclinical atherosclerosis of peripheral arteries. Subpopulations of neutrophils, lymphocytes and monocytes were phenotyped by flow cytometry using “Navios 6/2” (Beckman Coulter).

133 patients, 65 (48.8%) males and 68 (51.2%) females were included into the study. Correlation analysis showed that increased number of circulating CD16^{hi}CD11b^{lo}CD62L^{br} neutrophils was associated with increased number of regulatory T lymphocytes. The patients with subclinical atherosclerosis and absolute numbers of circulating immunosuppressive neutrophils within the first quartile (<136 cells/ μ L) had a statistically significantly lower number of regulatory T lymphocytes compared with patients in the 2-4 quartiles. An increase in immunosuppressive neutrophils was associated with decreased number of classical monocytes expressing TLR4 ($r = -0.335$; $p = 0.004$), and a decrease in TLR2 surface expression intensity ($r = -0.268$; $p = 0.023$) on the non-classical monocytes.

In patients with subclinical atherosclerosis of 40-64 years old, an increase in immunosuppressive CD16^{hi}CD11b^{lo}CD62L^{br} neutrophils was associated with increase in regulatory T lymphocytes and non-classical monocytes, as well as decrease in classic monocytes expressing TLR4, and lower intensity of TLR2 expression on the non-classical monocytes.

Keywords: neutrophils, immunosuppression, T cells, monocytes, atherosclerosis

Введение

Последние пятнадцать лет были отмечены стремительным прогрессом в изучении нейтрофилов [11]. Открытие транскрипционной пластичности нейтрофилов, их фенотипической и функциональной гетерогенности способствовали началу активного междисциплинарного изучения роли нейтрофилов при различных хронических воспалительных заболеваниях [1, 2, 4, 10, 17]. Важным проявлением функциональной пластичности нейтрофилов является их участие в регуляции как врожденного, так и адаптивного иммунного ответа [21, 42]. При этом комплексное взаимодействие нейтрофилов и других клеток врожденного и адаптивного иммунитета может иметь своим результатом не только активацию воспалительного ответа, но и иммуносупрессию и резольцию воспаления [29].

В 2010 году в исследовании на здоровых волонтерах, подвергшихся внутривенному введению липополисахарида *E. coli*, была описана субпопуляция зрелых циркулирующих нейтрофилов, демонстрирующих способность ингибировать пролиферацию Т-лимфоцитов и Т-клеточный иммунный ответ [25, 26, 35]. В настоящее время установлены несколько механизмов, посредством которых нейтрофилы данного подтипа могут реализовывать свои иммуносупрессорные и иммуномодулирующие эффекты: 1) опосредованное миелопероксидазой ингибирование активации дендритных клеток с последующим снижением активации и пролиферации CD4⁺Т-лимфоцитов; 2) супрессия активации Т-лимфоцитов посредством MAC-1 зависимого высвобождения H₂O₂ в иммунологический синапс между нейтрофилом и Т-лимфоцитом; 3) активация апоптоза Т-лимфоцитов через ось PD-L1/PD-1; 4) индукция регуляторных Т-лимфоцитов и синтез противовоспалительных цитокинов [20, 25, 39].

Предполагается, что увеличение в системной циркуляции иммуносупрессорных нейтрофилов может наблюдаться не только при сепсисе, но и при хроническом системном воспалении, которое наряду с нарушениями липидного обмена является важнейшим механизмом развития и прогрессирования атеросклероза [13, 29, 33]. Моноциты, дендритные клетки, Т-лимфоциты и нейтрофилы являются ключевыми участниками и модуляторами воспаления при атеросклерозе [30]. Потенциальное значение иммуносупрессорных нейтрофилов в атерогенезе и регуляции воспалительного ответа при атеросклерозе в настоящее время не установлено. Однако, принимая во внимание их возможные эффекты в отношении Т-лимфоцитов и клеток врожденно-

го иммунитета, изучение иммуносупрессорных нейтрофилов в контексте атеросклероза и атеросклеротических сердечно-сосудистых заболеваний (АССЗ) представляется перспективным направлением. **Целью исследования** являлось изучение взаимосвязей между количеством циркулирующих иммуносупрессорных нейтрофилов и субпопуляционным составом Т-лимфоцитов и моноцитов у пациентов с субклиническим атеросклерозом.

Материалы и методы

В исследование включали пациентов в возрасте 40-64 лет с субклиническим атеросклерозом периферических артерий, установленным по результатам проведения дуплексного сканирования артерий каротидного бассейна и артерий нижних конечностей. Критерием атеросклеротического поражения указанных сосудистых бассейнов являлось обнаружение атеросклеротической бляшки [3, 36].

При включении в исследование все пациенты подписывали информированное согласие. Протокол исследования был одобрен этическим комитетом ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России (протокол № 10 от 27.10.2018). Критериями невключения в исследование и/или исключения из исследования являлись следующие клинические состояния: установленные ранее АССЗ (цереброваскулярная болезнь в анамнезе; ишемическая болезнь сердца; заболевание периферических артерий; реваскуляризация коронарных или периферических артерий); тяжелые нарушения функции печени и почек (снижение скорости клубочковой фильтрации (СКФ) менее 30 мл/мин/1,73 м²); злокачественные новообразования; установленные ХВЗ; острые воспалительные или инфекционные заболевания в предшествующие 28 дней.

Определяли следующие лабораторные показатели: общий холестерин (ОХС), холестерин липопротеинов низкой плотности (ХС ЛНП), холестерин липопротеинов высокой плотности (ХС ЛПВП), триглицериды (ТГ), гликированный гемоглобин, креатинин с последующим расчетом скорости клубочковой фильтрации (СКФ) по формуле СКD-EPI, высокочувствительный С-реактивный белок (вчСРБ).

Фенотипирование субпопуляций нейтрофилов, лимфоцитов и моноцитов осуществляли методом проточной цитометрии на аппарате Navios 6/2 (Beckman Coulter) с использованием конъюгатов моноклональных антител: CD3 (PE-eFluor 610, eBioscience), CD4 (APC, eBioscience), CD8 (PE-Cy5.5, Invitrogen), CD19 (FITC, eBioscience), CD11b (FITC, eBioscience), CD127 (FITC,

eBioscience), CD14 (PerCP-Cy5.5, eBioscience), CD16-PE-Cy7.0 (Invitrogen, США), CD62L-PE (Beckman Coulter, США), CD282 (Alexa Flour 647, BioLegend, США), CD284 (PE, BioLegend, США). Экспрессию TLR2 и TLR4 на CD14⁺⁺CD16⁻ моноцитах (классические моноциты), CD14⁺CD16⁺ моноцитах (промежуточные моноциты), CD14⁺CD16⁺⁺ моноцитах (неклассические моноциты) определяли по средней интенсивности флуоресценции. Фенотипирование нейтрофилов, лимфоцитов и моноцитов проводили в цельной крови с детекцией не менее 30 000 событий. Стратегия гейтирования субпопуляций нейтрофилов была подробно описана нами ранее [9].

Анализ полученных данных проводили с использованием пакета статистического анализа данных IBM SPSS Statistics, версия 18. Качественные переменные описывали абсолютными и относительными частотами (процентами). Количественные переменные описывали медианой (Me) с указанием интерквартильного интервала ($Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$) в случае несоответствия распределения величины нормальному, средним (M) и стандартным отклонением (SD) — в случае нормального распределения величины. В целях определения взаимосвязей показателей использовали корреляционный анализ Спирмена. Для оценки значимости различий между двумя группами использовали критерий Манна–Уитни. Различия считали статистически значимыми при критическом уровне значимости 0,05.

Результаты

В исследование были включены 133 пациента, 65 (48,8%) мужчин и 68 (51,2%) женщин. Клиническая характеристика пациентов представлена в таблице 1.

Результаты проточной цитофлуорометрии представлены в таблице 2.

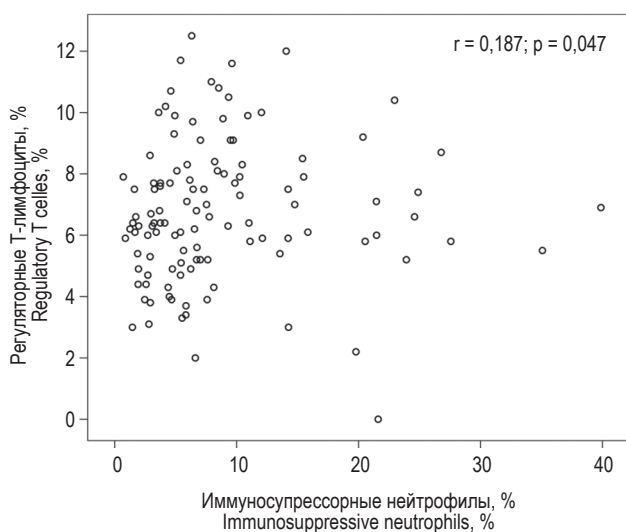
По результатам корреляционного анализа было установлено, что увеличение количества циркулирующих CD16^{hi}CD11b^{lo}CD62L^{br} нейтрофилов ассоциировалось с увеличением количества регуляторных Т-лимфоцитов (см. рис. 1).

Кроме того, у пациентов с субклиническим атеросклерозом, у которых абсолютное количество циркулирующих иммуносупрессорных нейтрофилов соответствовало первому квартилю (менее 136 кл/мкл), отмечалось статистически значимо меньшее количество регуляторных Т-лимфоцитов (см. рис. 2), в сравнении с пациентами из 2–4 квартиля.

При анализе взаимосвязей иммуносупрессорных нейтрофилов с моноцитами различных субпопуляций были установлены прямые корреляционные связи между количеством CD16^{hi}CD11b^{lo}CD62L^{br} нейтрофилов и неклассических моноцитов (см. рис. 3).

Увеличение количества иммуносупрессорных нейтрофилов ассоциировалось с уменьшением количества классических моноцитов, экспрессирующих TLR4 ($r = -0,335$; $p = 0,004$), а также с уменьшением интенсивности экспрессии TLR2

А (A)



Б (B)

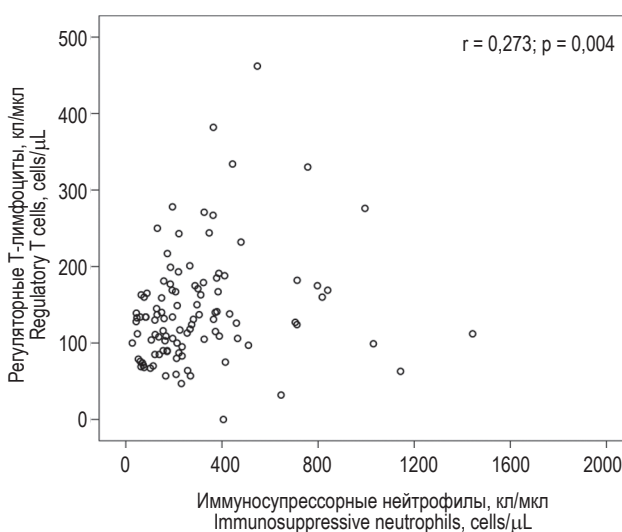


Рисунок 1. Взаимосвязи между количеством (в относительных (А) и абсолютных (Б) значениях) иммуносупрессорных нейтрофилов и регуляторных Т-лимфоцитов

Figure 1. Relationships between the number (in relative (A) and absolute (B) values) of immunosuppressed neutrophils and regulatory T lymphocytes

ТАБЛИЦА 1. КЛИНИЧЕСКАЯ И ЛАБОРАТОРНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПАЦИЕНТОВ

TABLE 1. CLINICAL AND LABORATORY CHARACTERISTICS OF PATIENTS

Показатели / Parameters	Пациенты / Patients (n = 133)
Возраст, лет, Ме (ИИ) Age, years, Me (IQR)	52,0 (46,0-57,0)
ИМТ, кг/м², Ме (ИИ) BMI, kg/m ² , Me (IQR)	26,9 (24,3-30,3)
Ожирение, n (%) Obesity, n (%)	37 (27,8)
Абдоминальное ожирение, n (%) Abdominal obesity, n (%)	73 (54,8)
Курение, n (%) Smoking, n (%)	23 (17,3)
СД 2 типа, n (%) Type 2 diabetes mellitus, n (%)	7 (5,26)
Артериальная гипертензия (АГ), n (%) Hypertension, n (%)	75 (56,4)
Субклинический атеросклероз артерий каротидного бассейна, n (%) Subclinical carotid atherosclerosis, n (%)	117 (87,9)
Субклинический атеросклероз артерий нижних конечностей, n (%) Subclinical atherosclerosis of lower limb arteries, n (%)	86 (64,6)
Дезагреганты, n (%) Antiplatelets, n (%)	19 (14,3)
Бета-адреноблокаторы, n (%) Beta-blockers, n (%)	26 (19,5)
Ингибиторы РААС, n (%) RAAS-inhibitors, n (%)	42 (31,6)
Диуретики, n (%) Diuretics, n (%)	16 (12,0)
Статины, n (%) Statins, n (%)	35 (26,3)
Пероральные сахароснижающие препараты, n (%) Antidiabetics medications, n (%)	7 (5,26)
ОХС, ммоль/л, Ме (ИИ) TC, mmol/l, Me (IQR)	5,87 (4,98-6,62)
ХС ЛНП, ммоль/л, Ме (ИИ) LDL-cholesterol, mmol/l, Me (IQR)	3,65 (2,96-4,38)
ХС ЛВП, ммоль/л, Ме (ИИ) HDL-cholesterol, mmol/l, Me (IQR)	1,35 (1,19-1,61)
ТГ, ммоль/л, Ме (ИИ) TG, mmol/l, Me (IQR)	1,30 (1,00-1,80)
ВчСРБ, мг/л, Ме (ИИ) HsCRP, mg/l, Me (IQR)	2,52 (1,37-3,13)
Гликированный гемоглобин, %, Ме (ИИ) Glycated hemoglobin, %, Me (IQR)	5,73 (5,27-6,05)
СКФ, мл/мин/1,73 м², Ме (ИИ) GFR, ml/min/1.73 m ² , Me (IQR)	69,5 (61,0-86,0)

Примечание. ИМТ – индекс массы тела; СД – сахарный диабет; РААС – ренин-ангиотензин-альдостероновая система; ОХС – общий холестерин; ХС ЛНП – холестерин липопротеинов низкой плотности; ХС ЛВП – холестерин липопротеинов высокой плотности; ТГ – триглицериды; вчСРБ – высокочувствительный С-реактивный белок; СКФ – скорость клубочковой фильтрации; Ме – медиана; ИИ – интерквартильный интервал.

Note. BMI, body mass index; RAAS, renin-angiotensin-aldosterone system; TC, total cholesterol; LDL, low-density lipoprotein; HDL, high-density lipoprotein; TG, triglycerides; hsCRP, high-sensitivity C-reactive protein; GFR, glomerular filtration rate; Me, median; IQR, interquartile range.

ТАБЛИЦА 2. РЕЗУЛЬТАТЫ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ

TABLE 2. FLOW CYTOMETRY RESULTS

Показатели / Parameters	Пациенты / Patients (n = 133)
CD16^{hi}CD11b^{hi}CD62L^{hi} (зрелые нейтрофилы) CD16 ^{hi} CD11b ^{hi} CD62L ^{hi} (mature neutrophils)	
Абсолютные значения, кл/мкл Absolute values, cells/ μ L	3009,0 (2332,0-3524,0)
Относительные значения, % Relative values, %	89,8 (83,4-93,2)
CD16^{hi}CD11b^{lo}CD62L^{br} (иммуносупрессорные нейтрофилы) CD16 ^{hi} CD11b ^{lo} CD62L ^{br} (immunosuppressive neutrophils)	
Абсолютные значения, кл/мкл Absolute values, cells/ μ L	221,0 (136,0-379,0)
Относительные значения, % Relative values, %	6,61 (4,01-10,90)
CD3⁺ (Т-лимфоциты) CD3 ⁺ (T lymphocytes)	
Абсолютные значения, кл/мкл Absolute values, cells/ μ L	1408 (1193-1780)
Относительные значения, % Relative values, %	74,9 (68,5-79,9)
CD19⁺ (В-лимфоциты) CD19 ⁺ (B lymphocytes)	
Абсолютные значения, кл/мкл Absolute values, cells/ μ L	233,0 (164,0-319,5)
Относительные значения, % Relative values, %	11,9 (9,13-14,60)
CD3⁺CD4⁺ (Т-хелперы) CD3 ⁺ CD4 ⁺ (T helpers)	
Абсолютные значения, кл/мкл Absolute values, cells/ μ L	910,0 (722,5-1138,0)
Относительные значения, % Relative values, %	46,5 (41,7-51,9)
CD3⁺CD8⁺ (Т-цитотоксические) CD3 ⁺ CD8 ⁺ (T cytotoxic)	
Абсолютные значения, кл/мкл Absolute values, cells/ μ L	487,0 (356,5-648,0)
Относительные значения, % Relative values, %	25,3 (19,6-29,6)
CD4⁺CD25⁺CD127⁻ (Т-лимфоциты регуляторные) CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD127 ⁻ (T regulatory lymphocytes)	
Абсолютные значения, кл/мкл Absolute values, cells/ μ L	131,5 (98,0-168,5)
Относительные значения, % Relative values, %	6,50 (5,30-7,93)
CD14⁺⁺CD16⁻ (классические моноциты) CD14 ⁺⁺ CD16 ⁻ (classical monocytes)	
Абсолютные значения, кл/мкл Absolute values, cells/ μ L	157,0 (59,0-349,2)
Относительные значения, % Relative values, %	46,0 (13,1-74,6)
CD14⁺⁺CD16⁺ (промежуточные моноциты) CD14 ⁺⁺ CD16 ⁺ (intermediate monocytes)	
Абсолютные значения, кл/мкл Absolute values, cells/ μ L	55,0 (21,0-240,0)

Таблица 2 (окончание)
Table 2 (continued)

Показатели / Parameters	Пациенты / Patients (n = 133)
Относительные значения, % Relative values, %	12,6 (4,24-51,00)
CD14⁺CD16⁺⁺ (неклассические моноциты) CD14 ⁺ CD16 ⁺⁺ (non-classical monocytes)	
Абсолютные значения, кл/мкл Absolute values, cells/ μ L	28,0 (15,0-49,0)
Относительные значения, % Relative values, %	6,30 (3,49-9,71)
CD14⁺⁺CD16⁻TLR2⁺	
Абсолютные значения, кл/мкл Absolute values, cells/ μ L	90,5 (18,0-375,0)
Относительные значения, % Relative values, %	17,4 (4,19-93,80)
Средняя интенсивность флуоресценции, усл. ед. Mean fluorescent intensity, c. u.	47,1 (8,59-72,90)
CD14⁺⁺CD16⁻TLR4⁺	
Абсолютные значения, кл/мкл Absolute values, cells/ μ L	295,5 (96,5-406,0)
Относительные значения, % Relative values, %	65,9 (29,9-93,4)
Средняя интенсивность флуоресценции, усл. ед. Mean fluorescent intensity, c. u.	5,97 (1,87-17,20)
CD14⁺⁺CD16⁺TLR2⁺	
Абсолютные значения, кл/мкл Absolute values, cells/ μ L	393,0 (225,7-485,0)
Относительные значения, % Relative values, %	82,3 (53,4-98,0)
Средняя интенсивность флуоресценции, усл. ед. Mean fluorescent intensity, c. u.	35,8 (9,92-48,90)
CD14⁺⁺CD16⁺TLR4⁺	
Абсолютные значения, кл/мкл Absolute values, cells/ μ L	403,5 (211,7-503,0)
Относительные значения, % Relative values, %	94,4 (48,9-98,6)
Средняя интенсивность флуоресценции, усл. ед. Mean fluorescent intensity, c. u.	6,69 (1,85-11,70)
CD14⁺CD16⁺⁺TLR2⁺	
Абсолютные значения, кл/мкл Absolute values, cells/ μ L	344,5 (201,2-467,0)
Относительные значения, % Relative values, %	87,3 (47,1-98,3)
Средняя интенсивность флуоресценции, усл. ед. Mean fluorescent intensity, c. u.	16,1 (5,75-24,00)
CD14⁺CD16⁺⁺TLR4⁺	
Абсолютные значения, кл/мкл Absolute values, cells/ μ L	433,0 (339,5-530,0)
Относительные значения, % Relative values, %	95,6 (87,1-98,3)
Средняя интенсивность флуоресценции, усл. ед. Mean fluorescent intensity, c. u.	6,77 (3,71-8,83)

Примечание. кл/мкл – клеток в 1 микролитре; усл. ед. – условные единицы.

Note. cells/ μ L, cells in 1 microliter; c. u., conventional units.

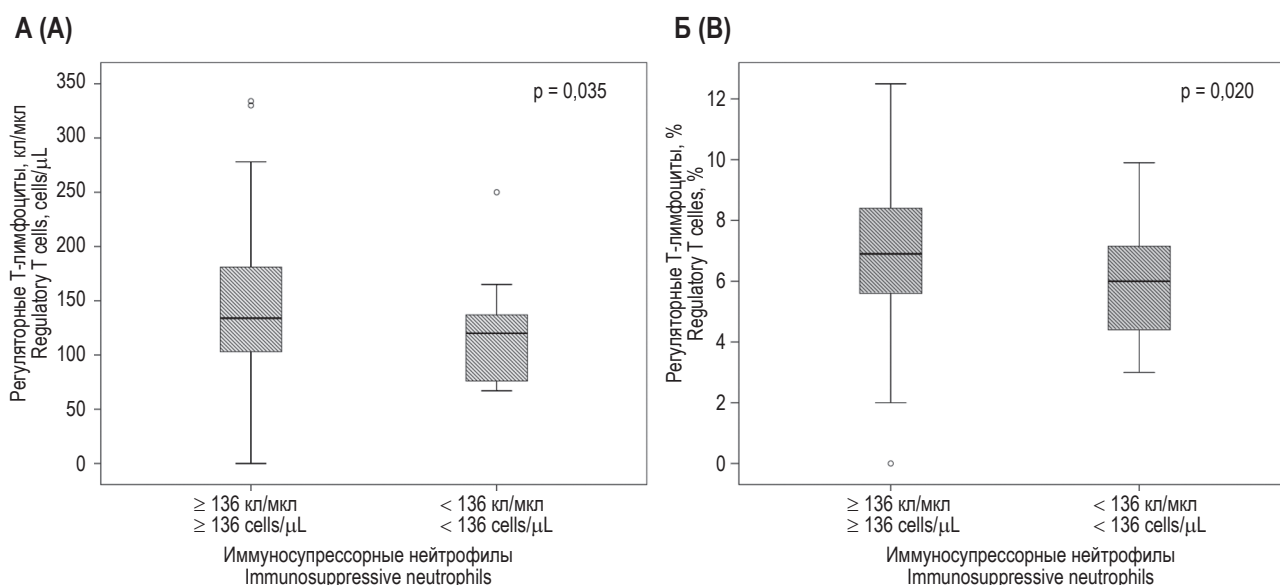


Рисунок 2. Абсолютное (А) и относительное (Б) содержание регуляторных Т-лимфоцитов у пациентов из первого квартиля по количеству иммуносупрессорных нейтрофилов

Figure 2. Absolute (A) and relative (B) counts of regulatory T lymphocytes in patients from the first quartile of immunosuppressed neutrophils

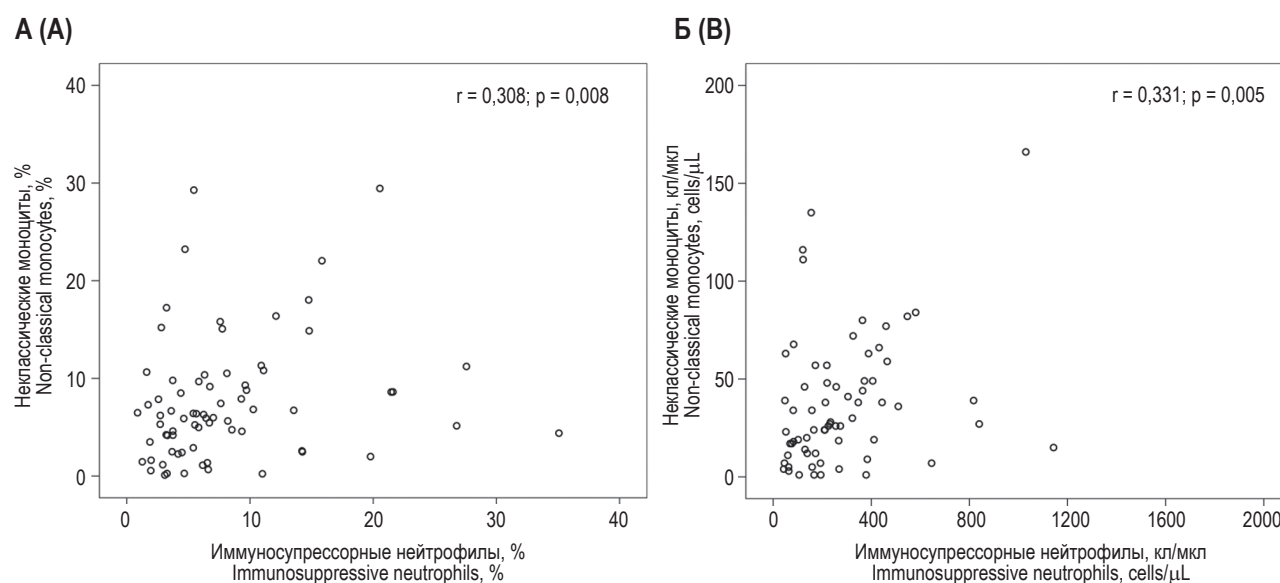


Рисунок 3. Взаимосвязи между количеством (в относительных (А) и абсолютных (Б) значениях) иммуносупрессорных нейтрофилов и неклассических моноцитов

Figure 3. Relationships between the numbers (in relative (A) and absolute (B) values) of immunosuppressed neutrophils and non-classical monocytes

($r = -0,268$; $p = 0,023$) на неклассических моноцитах.

Обсуждение

Изучение иммуносупрессорных нейтрофилов в настоящее время наиболее активно ведется в области онкоиммунологии. Иммуносупрессорные нейтрофилы, находящиеся как в системной циркуляции, так и составляющие локальное

микроокружение опухоли, рассматриваются как активные участники канцерогенеза, подавляющие противоопухолевую активность других иммунных клеток и детерминирующие развитие резистентности к ингибиторам контрольных точек иммунитета [8, 12]. Несмотря на то, что важная роль нейтрофилов в развитии атеросклероза и атеротромбоза на сегодняшний день не подлежит сомнению, данные о возможной роли иммуносупрессорных нейтрофилов в регуляции воспали-

тельного ответа при атеросклерозе практически отсутствуют [16, 34].

Основными результатами представленного исследования являются: 1) у пациентов 40–64 лет с субклиническим атеросклерозом иммуносупрессорные CD16^{hi}CD11b^{lo}CD62L^{br} нейтрофилы составляют в среднем 6,61% от общего пула циркулирующих нейтрофилов; 2) увеличение иммуносупрессорных нейтрофилов ассоциируется с увеличением количества регуляторных Т-лимфоцитов; 3) количество иммуносупрессорных нейтрофилов прямо коррелирует с количеством неклассических моноцитов, обратно — с количеством классических моноцитов, экспрессирующих TLR4 и интенсивностью экспрессии TLR2 на неклассических моноцитах.

Ранее в нескольких исследованиях было показано, что одним из механизмов нейтрофил-индуцированной иммуносупрессии является опосредованная моноцитарными дендритными клетками стимуляция дифференцировки регуляторных Т-лимфоцитов [7, 32]. Другим возможным механизмом индукции регуляторных Т-лимфоцитов является зависимость от нейтрофильной аргиназы-1 активация сигнальных путей ROR t, ROR и mTOR [18, 24, 41]. Согласно современным представлениям, при атеросклерозе наблюдается снижение количества регуляторных Т-лимфоцитов и нарушение их функций [5]. Увеличение регуляторных Т-лимфоцитов, связанное с влиянием CD16^{hi}CD11b^{lo}CD62L^{br} нейтрофилов, потенциально может являться атеропротективным фактором с самостоятельным клиническим значением, что требует подтверждения в проспективных исследованиях. В экспериментальных исследованиях применение адоптивной клеточной терапии с использованием васкулотропных Т-регуляторных лимфоцитов, гиперэкспрессирующих CX3CR1, приводило к уменьшению прогрессирования атеромы, уменьшению содержания в ней липидного компонента и увеличению содержания соединительной ткани [6].

Моноциты и макрофаги являются доминирующим типом клеток врожденного иммунитета в атероме [40]. Биологические функции неклассических моноцитов и их роль в патогенезе хронических воспалительных заболеваний окончательно не установлены [22]. Более того, экспериментальные исследования, в которых изучались эффекты неклассических моноцитов на развитие и прогрессирование атеросклероза, продемонстрировали конфликтующие результаты [22]. Циркулирующие классические моноциты являются основным подтипом циркулирующих моноцитов, мигрирующих в сосудистую стенку и атерому

по мере развития атеросклероза [27]. Активация сигнальных путей, связанных с TLR4, экспрессирующимися на моноцитах, приводит к стимуляции их хемотаксиса и миграции в ткани, в т.ч. в сосудистую стенку [19]. Интенсивность экспрессии TLR2 и TLR4 на циркулирующих моноцитах может репрезентировать активность системного воспаления и тяжесть хронических воспалительных заболеваний [38]. Таким образом, активация TLR2- и TLR4-сигналинга, безусловно, является провоспалительным и проатерогенным фактором [14]. Возможно, установленное нами снижение количества классических моноцитов, экспрессирующих TLR4, и уменьшение экспрессии TLR2 на неклассических моноцитах, ассоциирующееся с количеством иммуносупрессорных нейтрофилов, также является демонстрацией их лимитирующих воспаление функций и потенциальных атеропротективных эффектов. Неклассические моноциты, вероятно, в меньшей степени способны к экстравазации и миграции в атерому и описываются как «патрулирующие» сосуды клетки, играющие ключевую роль в детекции повреждений сосудистой стенки и поддержании сосудистого гомеостаза [22, 28]. Ряд исследователей обозначают неклассические моноциты как «воспалительные» моноциты, что во многом связано с их возможностью продуцировать провоспалительные цитокины, в ряде случаев превышающую таковую у классических моноцитов [15, 23, 31]. С другой стороны, установлено, что неклассические моноциты после миграции в ткани могут трансформироваться в противовоспалительные M2-макрофаги, способствующие стабилизации атеромы [37]. Несмотря на то, что во многих клинических исследованиях увеличение количества неклассических моноцитов прямо коррелировало с тяжестью атеросклеротического поражения сосудов, целый ряд исследователей рассматривает как атеропротективную субпопуляцию моноцитов, чье увеличение является ответом на повреждение, направленным на его лимитирование [22].

Заключение

У пациентов с субклиническим атеросклерозом 40–64 лет увеличение количества иммуносупрессорных CD16^{hi}CD11b^{lo}CD62L^{br} нейтрофилов ассоциируется с увеличением содержания регуляторных Т-лимфоцитов и неклассических моноцитов, снижением количества классических моноцитов, экспрессирующих TLR4, и снижением интенсивности экспрессии TLR2 на неклассических моноцитах.

Список литературы / References

1. Долгушин И.И. Нейтрофильные гранулоциты: новые лица старых знакомых // Бюллетень сибирской медицины, 2019. Т. 18, № 1. С. 30-37. [Dolgushin I.I. Neutrophil granulocytes: new faces of old acquaintances. *Byulleten sibirskoy meditsiny = Bulletin of Siberian Medicine*, 2019, Vol. 18, no. 1, pp. 30-37. (In Russ.)]
2. Кузнецова А.С., Долгушина А.И., Савочкина А.Ю., Сумеркина В.А., Никушкина К.В., Емельянова Н.Б., Хайдукова И.В. Функциональная активность нейтрофилов у больных с атеросклеротическими стенозами чревного ствола // Российский иммунологический журнал, 2017. Т. 11, № 1. С. 35-41. [Kuznetsova A.S., Dolgushina A.I., Savochkina A.Yu., Sumerkina V.A., Nikushkina K.V., Emelyanova N.B., Khaidukova I.V. The functional activity of neutrophils in patients with atherosclerotic stenosis of the celiac trunk. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2017, Vol. 11, no. 1, pp. 35-41. (In Russ.)]
3. Кухарчук В.В., Ежов М.В., Сергиенко И.В., Арабидзе Г.Г., Бубнова М.Г., Балахонова Т.В., Гуревич В.С., Качковский М.А., Коновалов Г.А., Константинов В.О., Малышев П.П., Покровский С.Н., Соколов А.А., Сумароков А.Б., Горнякова Н.Б., Обрезан А.Г., Шапошник И.И. Диагностика и коррекция нарушений липидного обмена с целью профилактики и лечения атеросклероза. российские рекомендации, VII пересмотр // Атеросклероз и дислипидемии, 2020. Т. 38, № 1. С. 7-40. [Kukharchuk V.V., Ezhov M.V., Sergienko I.V., Arabidze G.G., Bubnova M.G., Balakhonova T.V., Gurevich V.S., Kachkovsky M.A., Kononov G.A., Konstantinov V.O., Malyshev P.P., Pokrovsky S.N., Sokolov A.A., Sumarov A.B., Gornyakova N.B., Obrezan A.G., Shaposhnik I.I. Diagnosis and correction of lipid metabolism disorders to prevent and treat atherosclerosis. russian recommendations, VII revision. *Ateroskleroz i dislipidemii = Atherosclerosis and Dyslipidemia*, 2020, Vol. 38, no. 1, pp. 7-40. (In Russ.)]
4. Осиков М.В., Бойко М.С., Симонян Е.В., Ушакова В.А. Иммуотропные эффекты витамина D3 в составе оригинальных ректальных суппозиторий при экспериментальном язвенном колите // Медицинская иммунология, 2021. Т. 23, № 3. С. 497-508. [Osikov M.V., Boyko M.S., Simonyan E.V., Ushakova V.A. Immunotropic effects of vitamin D3 in original rectal suppositories in experimental ulcerative colitis. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2021, Vol. 23, no. 3, pp. 497-508. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-IEO-2176.
5. Baardman J., Lutgens E. Regulatory T Cell metabolism in atherosclerosis. *Metabolites*, 2020, Vol. 10, no. 7, 279. doi: 10.3390/metabo10070279.
6. Bonacina F., Martini E., Svecla M., Nour J., Cremonesi M., Beretta G., Moregola A., Pellegatta F., Zampoleri V., Catapano A.L., Kallikourdis M., Norata G.D. Adoptive transfer of CX3CR1 transduced-T regulatory cells improves homing to the atherosclerotic plaques and dampens atherosclerosis progression. *Cardiovasc. Res.*, 2021, Vol. 117, no. 9, pp. 2069-2082.
7. Drifte G., Dunn-Siegrist I., Tissières P., Pugin J. Innate immune functions of immature neutrophils in patients with sepsis and severe systemic inflammatory response syndrome. *Crit. Care Med.*, 2013, Vol. 41, no. 3, pp. 820-832.
8. Faget J., Peters S., Quantin X., Meylan E., Bonnefoy N. Neutrophils in the era of immune checkpoint blockade. *J. Immunother. Cancer*, 2021, Vol. 9, no. 7, e002242. doi: 10.1136/jitc-2020-002242.
9. Genkel V., Dolgushin I., Baturina I., Savochkina A., Kuznetsova A., Pykhova L., Shaposhnik I. Associations between hypertriglyceridemia and circulating neutrophil subpopulation in patients with dyslipidemia. *Int. J. Inflam.*, 2021, Vol. 2021, 6695468. doi: 10.1155/2021/6695468.
10. Grieshaber-Bouyer R., Radtke F.A., Cunin P., Stifano G., Levescot A., Vijaykumar B., Nelson-Maney N., Blaustein R.B., Monach P.A., Nigrovic P.A.; ImmGen Consortium. The neutrophil transcriptional signature defines a single continuum of neutrophils across biological compartments. *Nat. Commun.*, 2021, Vol. 12, no. 1, 2856. doi: 10.1038/s41467-021-22973-9.
11. Gwyer Findlay E. We need to talk about neutrophils. *Immunology*, 2021, Vol. 164, no. 4, pp. 655-656.
12. Hedrick C.C., Malanchi I. Neutrophils in cancer: heterogeneous and multifaceted. *Nat. Rev. Immunol.*, 2021. Online ahead of print. doi: 10.1038/s41577-021-00571-6.
13. Hong L.Z., Xue Q., Shao H. Inflammatory markers related to innate and adaptive immunity in atherosclerosis: implications for disease prediction and prospective therapeutics. *J. Inflamm. Res.*, 2021, Vol. 14, pp. 379-392.
14. Huang R., Hu Z., Chen X., Cao Y., Li H., Zhang H., Li Y., Liang L., Feng Y., Wang Y., Su W., Kong Z., Melgiri N.D., Jiang L., Li X., Du J., Chen Y. The transcription factor SUB1 is a master regulator of the macrophage TLR response in atherosclerosis. *Adv. Sci. (Weinh)*, 2021, Vol. 8, no. 19, e2004162. doi: 10.1002/advs.202004162.
15. Kapellos T.S., Bonaguro L., Gemünd I., Reusch N., Saglam A., Hinkley E.R., Schultze J.L. Human monocyte subsets and phenotypes in major chronic inflammatory diseases. *Front. Immunol.*, 2019, Vol. 10, pp. 2035. doi: 10.3389/fimmu.2019.02035.
16. Klopff J., Brostjan C., Eilenberg W., Neumayer C. Neutrophil extracellular traps and their implications in cardiovascular and inflammatory disease. *Int. J. Mol. Sci.*, 2021, Vol. 22, no. 2, 559. doi: 10.3390/ijms22020559.
17. Kvedaraite E. Neutrophil-T cell crosstalk in inflammatory bowel disease. *Immunology*, 2021, Vol. 164, no. 4, pp. 657-664.

18. Li Y., Wang W., Yang F., Xu Y., Feng C., Zhao Y. The regulatory roles of neutrophils in adaptive immunity. *Cell Commun. Signal.*, 2019, Vol. 17, no. 1, 147. doi: 10.1186/s12964-019-0471-y.
19. Liu Z., Jiang Y., Li Y., Wang J., Fan L., Scott M.J., Xiao G., Li S., Billiar T.R., Wilson M.A., Fan J. TLR4 Signaling augments monocyte chemotaxis by regulating G protein-coupled receptor kinase 2 translocation. *J. Immunol.*, 2013, Vol. 191, no. 2, pp. 857-864.
20. Lok L.S.C., Clatworthy M.R. Neutrophils in secondary lymphoid organs. *Immunology*, 2021, Vol. 164, no. 4, pp. 677-688.
21. Minns D., Smith K.J., Findlay E.G. Orchestration of adaptive T cell responses by neutrophil granule contents. *Mediators Inflamm.*, 2019, Vol. 10, 8968943. doi: 10.1155/2019/8968943.
22. Narasimhan P.B., Marcovecchio P., Hamers A.A.J., Hedrick C.C. Nonclassical monocytes in health and disease. *Annu. Rev. Immunol.*, 2019, Vol. 37, pp. 439-456.
23. Ożańska A., Szymczak D., Rybka J. Pattern of human monocyte subpopulations in health and disease. *Scand. J. Immunol.*, 2020, Vol. 92, no. 1, e12883. doi: 10.1111/sji.12883.
24. Pang B., Zhen Y., Hu C., Ma Z., Lin S., Yi H. Myeloid-derived suppressor cells shift Th17/Treg ratio and promote systemic lupus erythematosus progression through arginase-1/miR-322-5p/TGF- β pathway. *Clin. Sci. (Lond.)*, 2020, Vol. 134, no. 16, pp. 2209-2222.
25. Pillay J., Kamp V.M., van Hoffen E., Visser T., Tak T., Lammers J.W., Ulfman L.H., Leenen L.P., Pickkers P., Koenderman L. A subset of neutrophils in human systemic inflammation inhibits T cell responses through Mac-1. *J. Clin. Invest.*, 2012, Vol. 122, no. 1, pp. 327-336.
26. Pillay J., Ramakers B.P., Kamp V.M., Loi A.L., Lam S.W., Hietbrink F., Leenen L.P., Tool A.T., Pickkers P., Koenderman L. Functional heterogeneity and differential priming of circulating neutrophils in human experimental endotoxemia. *J. Leukoc. Biol.*, 2010, Vol. 88, no. 1, pp. 211-220.
27. Robbins C.S., Chudnovskiy A., Rauch P.J., Figueiredo J.L., Iwamoto Y., Gorbato R., Etzrodt M., Weber G.F., Ueno T., van Rooijen N., Mulligan-Kehoe M.J., Libby P., Nahrendorf M., Pittet M.J., Weissleder R., Swirski F.K. 2012. Extramedullary hematopoiesis generates Ly-6Chigh monocytes that infiltrate atherosclerotic lesions. *Circulation*, 2012, Vol. 125, no. 2, pp. 364-374.
28. Robinson A., Han C.Z., Glass C.K., Pollard J.W. Monocyte regulation in homeostasis and malignancy. *Trends Immunol.*, 2021, Vol. 42, no. 2, pp. 104-119.
29. Rosales C. Neutrophil: a cell with many roles in inflammation or several cell types? *Front. Physiol.*, 2018, Vol. 20, no. 9, 113. doi: 10.3389/fphys.2018.00113
30. Roy P., Orecchioni M., Ley K. How the immune system shapes atherosclerosis: roles of innate and adaptive immunity. *Nat. Rev. Immunol.*, 2021. Online ahead of print. doi: 10.1038/s41577-021-00584-1.
31. Sampath P., Moideen K., Ranganathan U.D., Bethunaickan R. Monocyte subsets: phenotypes and function in tuberculosis infection. *Front. Immunol.*, 2018, Vol. 9, 1726. doi: 10.3389/fimmu.2018.01726.
32. Scapini P., Cassatella M.A. Social networking of human neutrophils within the immune system. *Blood*, 2014, Vol. 124, no. 5, pp. 710-719.
33. Schäfer S., Zerneck A. CD8⁺ T cells in atherosclerosis. *Cells*, 2020, Vol. 10, no. 1, 37. doi: 10.3390/cells10010037.
34. Silvestre-Roig C., Braster Q., Ortega-Gomez A., Soehnlein O. Neutrophils as regulators of cardiovascular inflammation. *Nat. Rev. Cardiol.*, 2020, Vol. 17, no. 6, pp. 327-340.
35. Silvestre-Roig C., Hidalgo A., Soehnlein O. Neutrophil heterogeneity: implications for homeostasis and pathogenesis. *Blood*, 2016, Vol. 127, no. 18, pp. 2173-2181.
36. Sprynger M., Rigo F., Moonen M., Aboyans V., Edvardsen T., de Alcantara M.L., Brodmann M., Naka K.K., Kownator S., Simova I., Vlachopoulos C., Wautrecht J.C., Lancellotti P; EACVI Scientific Documents Committee. Focus on echovascular imaging assessment of arterial disease: complement to the ESC guidelines (PARTIM 1) in collaboration with the Working Group on Aorta and Peripheral Vascular Diseases. *Eur. Heart J. Cardiovasc. Imaging*, 2018, Vol. 19, no. 11, pp. 1195-1221.
37. Thomas G., Tacke R., Hedrick C.C., Hanna R.N. Nonclassical patrolling monocyte function in the vasculature. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2015, Vol. 35, no. 6, pp. 1306-1316.
38. Torres-Ruiz J., Carrillo-Vazquez D.A., Padilla-Ortiz D.M., Vazquez-Rodriguez R., Nuñez-Alvarez C., Juarez-Vega G., Gomez-Martin D. TLR expression in peripheral monocyte subsets of patients with idiopathic inflammatory myopathies: association with clinical and immunological features. *J. Transl. Med.*, 2020, Vol. 18, no. 1, 125. doi: 10.1186/s12967-020-02290-3.
39. Vlkova M., Chovancova Z., Nechvatilova J., Connelly A.N., Davis M.D., Slanina P., Travnickova L., Litzman M., Grymova T., Soucek P., Freiburger T., Litzman J., Hel Z. Neutrophil and granulocytic myeloid-derived suppressor cell-mediated T cell suppression significantly contributes to immune dysregulation in common variable immunodeficiency disorders. *J. Immunol.*, 2019, Vol. 202, no. 1, pp. 93-104.
40. Willemsen L., de Winther M.P. Macrophage subsets in atherosclerosis as defined by single-cell technologies. *J. Pathol.*, 2020, Vol. 250, no. 5, pp. 705-714.

41. Wu H., Zhen Y., Ma Z., Li H., Yu J., Xu Z.G., Wang X.Y., Yi H., Yang Y.G. Arginase-1-dependent promotion of TH17 differentiation and disease progression by MDSCs in systemic lupus erythematosus. *Sci. Transl. Med.*, 2016, Vol. 8, no. 331, 331ra40. doi: 10.1126/scitranslmed.aae0482.

42. Xu Y., Zhang Q., Zhao Y. The functional diversity of neutrophils and clustered polarization of immunity. *Cell. Mol. Immunol.*, 2020, Vol. 17, no. 11, pp. 1212-1214.

Авторы:

Долгушин И.И. — д.м.н., профессор, заслуженный деятель науки РФ, академик РАН, заведующий кафедрой микробиологии, вирусологии, иммунологии, директор научно-исследовательского института иммунологии, президент ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Челябинск, Россия

Генкель В.В. — к.м.н., доцент кафедры пропедевтики внутренних болезней ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Челябинск, Россия

Батурина И.Л. — к.м.н., старший научный сотрудник научно-исследовательского института иммунологии ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Челябинск, Россия

Савочкина А.Ю. — д.м.н., профессор кафедры клинической лабораторной диагностики, главный научный сотрудник научно-исследовательского института иммунологии ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Челябинск, Россия

Минасова А.А. — к.б.н., доцент кафедры микробиологии, вирусологии, иммунологии ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Челябинск, Россия

Никущкина К.В. — к.м.н., ведущий научный сотрудник научно-исследовательского института иммунологии ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Челябинск, Россия

Пыхова Л.Р. — старший преподаватель кафедры микробиологии, вирусологии, иммунологии ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Челябинск, Россия

Кузнецова А.С. — к.м.н., доцент кафедры госпитальной терапии ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Челябинск, Россия

Шапошник И.И. — д.м.н., профессор, заведующий кафедрой пропедевтики внутренних болезней ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Челябинск, Россия

Authors:

Dolgushin I.I., PhD, MD (Medicine), Professor, Honored Scientist of Russia, Full Member, Russian Academy of Sciences, Head, Department of Microbiology, Virology, Immunology, Director, Research Institute of Immunology, President, South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

Genkel V.V., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Propedeutics of Internal Diseases, South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

Baturina I.L., PhD (Medicine), Senior Research Associate, Research Institute of Immunology, South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

Savochkina A.Yu., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Clinical Laboratory Diagnostics, Main Research Associate, Research Institute of Immunology, South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

Minasova A.A., PhD (Biology), Associate Professor, Department of Microbiology, Virology and Immunology, South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

Nikushkina K.V., PhD (Medicine), Leading Research Associate, Research Institute of Immunology, South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

Pykhova L.R., Senior Lecturer, Department of Microbiology, Virology and Immunology, South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

Kuznetsova A.S., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Hospital Therapy, South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

Shaposhnik I.I., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Propedeutics of Internal Diseases, South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

АССОЦИАЦИЯ СИСТЕМНОГО КЛЕТОЧНОГО ИММУНИТЕТА С РАЗВИТИЕМ КАТАРАКТЫ

Османов Р.Э., Фабрикантов О.Л.

Тамбовский филиал ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» имени академика С.Н. Федорова»
Министерства здравоохранения РФ, г. Тамбов, Россия

Резюме. Среди причин нарушения зрения катаракта занимает значительный удельный вес, что указывает на необходимость изучения причин ее развития, в структуре которых в последние годы отводится важная роль нарушению иммунорегуляторных реакций. Однако участие составляющих системного клеточного иммунитета в формировании различных форм катаракты остается практически неизвестным. Цель исследования — изучение ассоциации параметров системного клеточного иммунитета с развитием зрелой ядерной катаракты. На базе Тамбовского филиала МНТК «Микрохирургия глаза имени академика С.Н. Федорова» в 2019–2020 гг. проведено изучение основных субпопуляций иммунных клеток в крови у 63 пациентов в возрасте 60–84 лет, страдающих зрелой ядерной катарактой, составивших основную группу. Контролем служили 47 пациентов в возрасте от 60 до 84 лет с отсутствием офтальмологических заболеваний в анамнезе и в момент обследования. Определены кластера дифференцировки клеток осуществлены статистически значимое снижение абсолютного количества $CD19^+$ до $0,18 \pm 0,03 \times 10^9/\text{л}$ у пациентов основной группы против $0,42 \pm 0,05 \times 10^9/\text{л}$ в контрольной группе, относительного числа $CD19^+$ до $8,36 \pm 1,1\%$ против $19,64 \pm 1,3\%$ соответственно, абсолютного содержания $CD3^+$ до $0,92 \pm 0,08 \times 10^9/\text{л}$ против $1,57 \pm 0,06 \times 10^9/\text{л}$ соответственно. Напротив, в крови больных со зрелой ядерной катарактой существенно возросло абсолютное число $CD56^+$ до $0,27 \pm 0,02 \times 10^9/\text{л}$ по сравнению с $0,15 \pm 0,03 \times 10^9/\text{л}$ в группе возрастного контроля. Величины относительного риска статистически значимы и наиболее высокие выявлены для кластера $CD19^+$ и $CD3^+$, составившие соответственно для абсолютного числа 3,237 и 2,954, а относительного числа 1,952 и 2,748. Это позволяет утверждать, что развитие зрелой ядерной катаракты ассоциируется прежде всего со снижением абсолютного и относительного содержания В- и Т-лимфоцитов на системном уровне, что может иметь практическое значение при использовании в качестве иммунологических маркеров ядерной катаракты.

Ключевые слова: катаракта, системный иммунитет, клеточный иммунитет

ASSOCIATION OF SYSTEMIC CELLULAR IMMUNITY WITH THE DEVELOPMENT OF CATARACT

Osmanov R.E., Fabrikantov O.L.

S. Fyodorov Eye Microsurgery Federal State Institution, Tambov Branch, Tambov, Russian Federation

Abstract. Among the causes of visual impairment, cataract occupies a significant proportion, which indicates a need for studying the causes of its development. Over recent years, an important role has been given to impaired immunoregulatory reactions in its genesis. So far, however, participation of systemic cellular immunity in

Адрес для переписки:

Османов Руслан Эседуллаевич
Тамбовский филиал ФГАУ «НМИЦ «МНТК
«Микрохирургия глаза» имени академика С.Н. Федорова»
Министерства здравоохранения РФ
392000, Россия, г. Тамбов, Рассказовское шоссе, 1.
Тел.: 8 (910) 740-96-13.
E-mail: vitalaxen@mail.ru

Address for correspondence:

Osmanov Ruslan E
S. Fyodorov Eye Microsurgery Federal State Institution,
Tambov Branch
392000, Russian Federation, Tambov,
Rasskazovskoe highway, 1.
Phone: 7 (910) 740-96-13.
E-mail: vitalaxen@mail.ru

Образец цитирования:

Р.Э. Османов, О.Л. Фабрикантов «Ассоциация системного клеточного иммунитета с развитием катаракты» // Медицинская иммунология, 2022. Т. 24, № 2. С. 295–300. doi: 10.15789/1563-0625-AOS-2454
© Османов Р.Э., Фабрикантов О.Л., 2022

For citation:

R.E. Osmanov, O.L. Fabrikantov «Association of systemic cellular immunity with the development of cataract», Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2022, Vol. 24, no. 2, pp. 295–300.
doi: 10.15789/1563-0625-AOS-2454
DOI: 10.15789/1563-0625-AOS-2454

occurrence of different clinical types of cataract remains poorly known. The aim of the present study was to assess association between parameters of systemic cellular immunity and development of mature nuclear cataract. On the basis of IRTC "S.N. Fedorov Eye Microsurgery Center" (Tambov Branch), a study of major immune cells subpopulations in peripheral blood was performed over 2019–2020 in 63 patients aged 60–84 years, suffering from mature nuclear cataract (the study group). The control group consisted of 47 patients aged 60 to 84 years without ocular disorders in the history and at the time of examination. The evaluation of differentiated cell clusters was carried out with BD FACS Canto II flow cytometer. As a result, a statistically significant decrease in the absolute number of CD19⁺ to $0.18 \pm 0.003 \times 10^9/L$ was revealed in the patients from the main group *versus* $0.42 \pm 0.05 \times 10^9/L$ in controls; the relative number of CD19⁺ was decreased to $8.36 \pm 1.1\%$ *versus* $19.64 \pm 1.3\%$, respectively, along with absolute content of CD3⁺ cells of $0.92 \pm 0.08 \times 10^9/L$ *versus* $1.57 \pm 0.06 \times 10^9/L$ in controls. On the contrary, the absolute number of CD56⁺ in the patients with mature nuclear cataract was significantly increased to $0.27 \pm 0.02 \times 10^9/L$ compared to $0.15 \pm 0.03 \times 10^9/L$ in the age control group. The relative risk values are statistically significant, and the highest levels were found for CD19⁺ and CD3⁺ cell clusters, which were 3.237 and 2.954 for the absolute number, and 1.952 and 2.748, for the relative number, respectively. These findings suggest that development of a mature nuclear cataract is associated primarily with a decrease in absolute and relative contents of B and T lymphocytes at the systemic level, which may be of practical importance when used as immunological markers of nuclear cataract.

Keywords: cataract, systemic immunity, cellular immunity

Введение

Катаракта — самая распространенная причина слепоты в мире, на которую приходится 50–80% случаев слепоты, и особенно в развивающихся странах [11, 15]. Согласно недавно опубликованным данным во всемирно авторитетном журнале Lancet, в мире насчитывается 17 миллионов слепых вследствие катаракты, что существенно выше, чем вследствие других офтальмологических заболеваний [10]. Катаракта существенно ограничивает социальную и бытовую активность пациентов, снижает качество жизни [3, 7].

Катаракта представляет возрастассоциированное заболевание, и возраст рассматривается как один из ведущих факторов риска [3, 11], но в последние годы в развитии катаракты активно изучается воспалительный компонент [8], медиаторами которого выступают иммунологические реакции, обусловленные цитокинами, клеточным и гуморальным иммунитетом как на системном, так и на локальном уровнях. При этом более исследованными среди иммунологических механизмов развития катаракты являются цитокины [1]. В отдельных публикациях, основанных на ограниченном числе проанализированных интерлейкинов, указывается на их важную роль в формировании катаракты и прежде таких цитокинов крови, как IL-1 β , TNF α [8], а в отдельных работах [8] показано значение IL-4 и IL-6 в генезе обсуждаемой офтальмопатологии.

Однако участие представителей системного клеточного иммунитета в формировании зрелой катаракты рассматривается крайне редко и некоторые результаты противоречивы и нуждаются в уточнении. Поэтому изучение показателей клеточного иммунитета крови у пациентов старшего возраста с зрелой ядерной катарактой, представляющей наиболее распространенную форму катаракты, следует считать актуальной научно-практической задачей медицинской иммунологии и офтальмологии.

Цель исследования — изучение ассоциации параметров системного клеточного иммунитета с развитием зрелой ядерной катаракты.

Материалы и методы

Клиническое исследование проведено в Тамбовском филиале МНТК «Микрохирургия глаза имени академика С.Н. Федорова» в 2019–2020 годах среди 63 пациентов в возрасте 60–84 лет, страдающих зрелой ядерной катарактой, составивших основную группу. Контролем служили 47 пациентов аналогичного возраста, не имеющих офтальмологической патологии на момент обследования и в анамнезе.

Всем пациентам обеих групп выполнено полное офтальмологическое обследование. Острота зрения определялась с помощью таблицы Снеллена, размещенной на расстоянии 6 метров, и проводилось двухкратное тестирование остроты зрения без коррекции и максимально скорректированной остроты зрения. У всех пациентов определена объективная и субъективная рефракция для выявления наличия или отсутствия аномалий рефракции. Кроме того, оценивались движения глазного яблока и функция зрачка. Обследование с помощью щелевой лампы проводилось для просмотра структур переднего и заднего сегментов глаза, а также применялась прямая и непрямая фундоскопия. Пациентам также выполнялась оптическая когерентная томография на аппарате DRI OCT Triton, Topson.

Забор периферической крови осуществлялся в утреннее время, натощак с использованием специальной пробирки Vacuette с антикоагулянтом. Затем кровь анализировали с использованием проточного цитометра Becton Dickinson FACS Canto II (BD Biosciences). При выполнении иммунофенотипированных клеток определяли их абсолютное и относительное число с применением соответствующих моноклональных антител.

При обработке результатов исследования использовалось программное обеспечение пакета

Statistica 10.0 с расчетом среднеарифметических величин и их ошибок. Для выявления ассоциации изученных показателей системного клеточного иммунитета производился расчет относительного риска по общепринятой методике [4]. Для оценки достоверности различий применялась критерии множественности сравнений — Краскела—Уоллиса и Манна—Уитни. Соответствие характера распределения количественных признаков нормальности распределения проведено по критерию Шапиро—Уилка. Статистически значимым принималось различие менее 0,05.

Исследование проведено с соблюдением этических норм и принципов Хельсинкской декларации.

Результаты

Среди пациентов системного клеточного иммунитета у пациентов, страдающих зрелой ядерной катарактой, наиболее выраженные изменения присущи содержанию В-лимфоцитов (CD19⁺) (табл. 1). Это относится как к абсолютному количеству В-лимфоцитов крови, так и их относительному со статистически значимым различием в обоих случаях. Абсолютное и относительное содержание субпопуляции В-лимфоцитов в крови при развитии зрелой ядерной катаракты статистически значимо и максимально уменьшилось по отношению ко всем

другим анализируемым субпопуляциям клеток, причем в равной степени для абсолютного числа и относительного содержания CD19⁺. Значительно у пациентов с наличием ядерной катаракты на системном уровне снизилось абсолютное число общей популяции Т-лимфоцитов по сравнению с пациентами аналогичного возраста, не имевших на момент обследования и в анамнезе каких-либо офтальмологических заболеваний. Статистически значимо, но в меньшей степени у пациентов с наличием зрелой ядерной катаракты уменьшилось относительное содержание общего кластера Т-лимфоцитов (CD3⁺), чем абсолютное количество этих иммунных клеток. Указанные выше изменения системного клеточного иммунитета привели к статистически значимому уменьшению иммунорегуляторного индекса у пациентов, страдающих зрелой ядерной катарактой, по сравнению с группой возрастного контроля.

Развитие зрелой ядерной катаракты, как свидетельствуют полученные результаты, сопровождается статистически значимым уменьшением абсолютного числа CD45⁺. Наряду с этим на системном уровне среди рассматриваемых параметров клеточного иммунитета установлено статистически значимое повышение абсолютного и относительного числа кластера CD56⁺, т.е. натуральных киллеров и особенно сказанное относительно к абсолютному содержанию CD56⁺ в крови. Содержание CD4⁺ и CD8⁺ как в абсолютных

ТАБЛИЦА 1. ПАРАМЕТРЫ СИСТЕМНОГО КЛЕТОЧНОГО ИММУНИТЕТА У ПАЦИЕНТОВ СО ЗРЕЛОЙ ЯДЕРНОЙ КАТАРАКТОЙ (M±m)

TABLE 1. PARAMETERS OF SYSTEMIC CELL IMMUNITY IN PATIENTS WITH A MATURE NUCLEAR CATARACT (M±m)

Показатель системного клеточного иммунитета, единица измерения Indicator of systemic cellular immunity, unit of measurement	Пациенты со зрелой ядерной катарактой Patients with mature nuclear cataract	Пациенты без офтальмологических заболеваний Patients without ophthalmic diseases	p
CD45 ⁺ , × 10 ⁹ /л CD45, × 10 ⁹ /L	1,54±0,12	1,98±0,14	0,0029
CD3 ⁺ , × 10 ⁹ /л CD3, × 10 ⁹ /L	0,92±0,08	1,57±0,06	0,0013
CD3 ⁺ , %	63,54±2,00	74,69±1,80	0,0019
CD4 ⁺ , × 10 ⁹ /л CD4 ⁺ , × 10 ⁹ /L	0,81±0,22	0,72±0,15	0,1985
CD4 ⁺ , %	40,28±2,10	43,51±2,40	0,1692
CD8 ⁺ , × 10 ⁹ /л CD8 ⁺ , × 10 ⁹ /L	0,51±0,13	0,37±0,12	0,2574
CD8 ⁺ , %	23,60±1,70	22,85±1,50	0,3420
Иммунорегуляторный индекс, усл. ед. Immunoregulatory index, c. u.	1,59±0,09	1,95±0,11	0,0037
CD19 ⁺ , × 10 ⁹ /л CD19 ⁺ , × 10 ⁹ /L	0,18±0,03	0,420±0,005	0,0028
CD19 ⁺ , %	8,36±1,10	19,64±1,30	0,0013
CD56 ⁺ , × 10 ⁹ /л CD56 ⁺ , × 10 ⁹ /L	0,27±0,02	0,15±0,03	0,0024
CD56 ⁺ , %	15,44±1,40	11,23±0,90	0,0047

ТАБЛИЦА 2. ОТНОСИТЕЛЬНЫЙ РИСК ДЛЯ ПОКАЗАТЕЛЕЙ СИСТЕМНОГО КЛЕТЧОГО ИММУНИТЕТА У ПАЦИЕНТОВ СО ЗРЕЛОЙ ЯДЕРНОЙ КАТАРАКТОЙ

TABLE 2. RELATIVE RISK FOR SYSTEMIC CELLULAR IMMUNITY INDICATORS IN PATIENTS WITH MATURE NUCLEAR CATARACT

Показатель системного клеточного иммунитета, единица измерения Indicator of systemic cellular immunity, unit of measurement	Относительный риск Relative risk	Доверительный интервал Confidence interval	p
CD45⁺, × 10⁹/л CD45, × 10 ⁹ /L	1,861	1,549-2,475	0,0018
CD3⁺, × 10⁹/л CD3, × 10 ⁹ /L	2,954	2,728-3,451	0,0009
CD3⁺, %	2,748	2,690-3,055	0,0012
CD4⁺, × 10⁹/л CD4 ⁺ , × 10 ⁹ /L	0,756	0,531-0,947	0,283
CD4⁺, %	0,627	0,326-0,814	0,341
CD8⁺, × 10⁹/л CD8 ⁺ , × 10 ⁹ /L	0,583	0,319-0,702	0,262
CD8⁺, %	0,322	0,115-0,489	0,218
Иммунорегуляторный индекс, усл. ед. Immunoregulatory index, c. u.	1,623	1,487-1,938	0,0021
CD19⁺, × 10⁹/л CD19 ⁺ , × 10 ⁹ /L	3,548	3,321-3,867	0,0006
CD19⁺, %	3,237	3,054-3,592	0,0008
CD56⁺, × 10⁹/л CD56 ⁺ , × 10 ⁹ /L	1,952	1,637-2,316	0,0019
CD56⁺, %	1,408	1,235-1,748	0,0027

величинах, так и в относительных величинах у больных со зрелой ядерной катарактой по сравнению с лицами того же возраста с отсутствием офтальмологической патологии в анамнезе и в настоящее время на системном уровне не имело статистически значимых различий.

Таким образом, при сформировавшейся зрелой ядерной катаракте в крови пациентов происходит значительное уменьшение абсолютного и относительного количества В-лимфоцитов и в меньшей степени снижение абсолютного числа лимфоцитов, абсолютного и относительного содержания Т-лимфоцитов, снижение иммунорегуляторного индекса при одновременном повышении абсолютного и относительного количества естественных киллеров.

Определение ассоциации формирования зрелой ядерной катаракты с установленными изменениями параметров системного клеточного иммунитета посредством расчета величин относительного риска свидетельствует о наибольшем вкладе снижения абсолютного и относительного числа В-лимфоцитов с более высокой величиной относительного риска для первого (табл. 2).

Снижение в крови абсолютного количества кластера CD19⁺ повышает вероятность развития зрелой ядерной катаракты в 3,548 раза, что максимально по отношению ко всем другим изученным кластерам. Высокий риск развития зре-

лой ядерной катаракты значительно повышается при снижении абсолютного и относительного содержания Т-лимфоцитов. Существенно ниже влияние общей популяции лимфоцитов на формирование обсуждаемой офтальмологической патологии. Снижение величины иммунорегуляторного индекса статистически значимо увеличивает риск развития ядерной катаракты.

Формирование зрелой ядерной катаракты также ассоциируется с повышением абсолютного и относительного количества в крови субпопуляции CD56⁺. При этом влияние повышенного абсолютного количества натуральных киллеров более существенно, чем относительное содержание данной субпопуляции в крови. Вместе с тем не установлено ассоциации абсолютно-го и относительного содержания Т-хелперов и Т-цитотоксических лимфоцитов с развитием зрелой ядерной катаракты. Расчетные величины относительного риска и их доверительные интервалы для вышеуказанных субпопуляций системного клеточного иммунитета у пациентов с катарактой оказались статистически незначимыми.

Обсуждение

Достоверное повышение уровня Т-хелперов крови у пациентов с катарактой более молодого возраста (44-53 лет), в отличие от результатов настоящего исследования, диагностировано в

работе, выполненной в Уганде [14]. В частности, относительное содержание субпопуляции $CD4^+$ в вышеуказанной когорте больных составляло $74,8 \pm 2,3\%$, что статистически значимо больше ($p = 0,0028$), чем у пациентов без катаракты. Однако менее существенное повышение содержания относительного количества Т-хелперов обнаружено у пациентов с катарактой, неинфицированных вирусом иммунодефицита человека по сравнению с больными катарактой, инфицированных вирусом иммунодефицита человека. Одновременно у пациентов зрелого возраста с катарактой (с отсутствием вируса иммунодефицита человека) произошло снижение в периферической крови кластера $CD3^+CD4^+ + CD38^+$. В целом у пациентов с катарактой и отсутствием вируса иммунодефицита человека активация клеточного иммунитета была выше, чем среди пациентов того же возраста без катаракты. По мнению авторов, это первая статья, в которой описывается регуляторная дисфункция Т-лимфоцитов у пациентов с катарактой с наличием и отсутствием инфицированности вирусом иммунодефицита человека [14].

В других исследованиях рассматривается дисфункция клеточного иммунитета у пациентов, страдающих катарактой после выполнения оперативного вмешательства [9, 13]. У двух групп пациентов, страдающих катарактой, клеточный иммунитет был изучен с помощью теста стимуляции лимфоцитов [9]. Одна группа больных протестирована до хирургии катаракты, а другая после оперативного вмешательства и установлена положительная стимуляция лимфоцитов до операции у 38% обследованных одним из антигенов. Экстракапсулярная экстракция хрусталика вызвала значительное увеличение числа пациентов с положительной активацией лимфоцитов по сравнению с пациентами обследованными до операции. Активация клеточного иммунитета после выполнения экстракапсулярной экстракции катаракты у пациентов с катарактой отмечена также в более ранней публикации [13].

В развитии катаракты локальное слабое хроническое воспаление (инфламэйджинг) может быть обусловлено не только установленными нами снижением на системном уровне абсолютного и относительного числа Т- и В-лимфоцитов абсолютного количества общей популяции лимфоцитов, снижением иммунорегуляторного индекса, повышением абсолютного и относительного содержания натуральных киллеров, но и выявленным Намазовой И.К. и др. [6] увеличением в сыворотке крови IL-1 β до $0,350 \pm 0,075$ пг/мл у пациентов 61–83 лет с катарактой до хирургиче-

ского лечения против $0,080 \pm 0,038$ пг/мл и TNF α до $1,070 \pm 0,141$ пг/мл против $0,093 \pm 0,044$ пг/мл соответственно. Установленные изменения в уровне системных цитокинов у пациентов с катарактой до хирургического вмешательства, по мнению авторов, важны, поскольку с позиций обеспечения местной защитной реакции путем инициации и регуляции воспалительного процесса, как основной функции IL-1 β и TNF α , нельзя исключить, что воспалительные цитокины могут способствовать раскрытию определенных закономерностей развития катаракты и прогнозирования потенциальных возможностей возникновения осложнений хирургического лечения катаракты. Особенно изучен цитокиновый профиль у пациентов с первичной глаукомой [2], а также в единичных публикациях сообщается об обсуждаемом нами клеточном иммунитете при катаракте и первичной глаукоме.

На системном уровне у больных с первичной открытоугольной глаукомой установлено повышение пролиферативной активности Т-хелперов, уменьшение представителей Т-звена иммунитета – $CD4^+/CD25^+FoxP3^+Tregs$ ($CD4Tregs$) и $CD8^+/CD25^+/FoxP3^+Tregs$ ($CD8Tregs$) [5].

У больных с глаукомой наблюдается также существенное повышение Т-цитотоксических клеток ($CD3^+CD8^+$), $CD5^+$ популяции В-лимфоцитов, что свидетельствует о значительных изменениях в соотношении субпопуляций при данной офтальмопатологии [16]. Кроме того, в экспериментальных условиях при моделировании глаукомы установлено участие аутореактивных клонов Т-лимфоцитов, имеющих специфичность к антигенами тканей глаза [12]. Однако при катаракте неизвестной остается роль других параметров клеточного иммунитета.

Заключение

Дисфункция системного клеточного иммунитета у пациентов со зрелой ядерной катарактой проявляется существенным снижением абсолютного и относительного числа Т- и В-лимфоцитов, абсолютного количества общей популяции лимфоцитов, снижением иммунорегуляторного индекса, повышением абсолютного и относительного содержания натуральных киллеров. Развитие зрелой ядерной катаракты в наибольшей степени ассоциируются с увеличением абсолютного и относительного числа в крови В- и Т-лимфоцитов, которые могут применяться в качестве иммунологических маркеров диагностики зрелой ядерной катаракты, а также в профилактике раннего формирования данного заболевания.

Список литературы / References

1. Агаева Т.С. Изучение роли изменений проницаемости клеточных мембран хрусталика в патогенезе катаракты // *Oftalmologiya*, 2016. № 2. С. 13–19. [Agaeva T.S. Studying the role of changes in the permeability of the cell membranes of the lens in the pathogenesis of cataracts. *Oftalmologiya = Ophthalmology*, 2016, no. 2, pp. 13–19. (In Russ.)]
2. Агарков Н.М., Чухраёв А.М., Яблокова Н.В. Диагностика и прогнозирование первичной открытоугольной глаукомы по уровню местных цитокинов // *Медицинская иммунология*, 2019. Т. 21, № 6. С. 1163–

1168. [Agarkov N.M., Chukhraev A.M., Yablokova N.V. Diagnosis and prognosis of primary open-angle glaucoma by the level of local cytokines. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2019, Vol. 21, no. 6, pp. 1163-1168. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2019-6-1163-1168.

3. Агарков Н.М., Яблоков М.М., Коняев Д.А., Попова Е.В. Влияние ультразвуковой факоэмульсификации на качество жизни пожилых пациентов с ядерно-кортикальной катарактой // Офтальмология, 2021. Т. 18, № 2. С. 325-330. [Agarkov N.M., Yablokov M.M., Konyayev D.A., Popova E.V. Influence of ultrasound phacoemulsification on the quality of life of elderly patients with nuclear cortical cataract. *Oftalmologiya = Ophthalmology*, 2021, Vol. 21, no. 2, pp. 325-330. (In Russ.)]

4. Айвазян С.А., Мхитарян В.С. Прикладная статистика и основы эконометрии. М.: ЮНИТИ, 2001. 656 с. [Ayvazyan S.A., Mkhitarayan V.S. Applied statistics and fundamentals of econometrics]. Moscow: UNITY, 2001. 656 p.

5. Балацкая Н.В., Петров С.Ю., Котелин В.И. Факторы врожденного иммунитета в патогенезе глаукомы и оптической нейропатии // Иммунопатология, аллергология, инфектология, 2021. № 1. С. 29-38. [Balatskaya N.V., Petrov S.Yu., Kotelkin V.I. Factors of innate immunity in the pathogenesis of glaucoma and optic neuropathy. *Immunopatologiya, allergologiya, infektologiya = Immunopathology, Allergology, Infectology*, 2021, no. 1, pp. 29-38. (In Russ.)]

6. Намазова И.К., Саилова Г.Т., Меджидова С.Р., Салманова А.Р. Определение цитокинов в сыворотке крови и во влаге передней камеры при псевдоэкзофалиативном синдроме и катаракте // Успехи геронтологии, 2020. Т. 33, № 2. С. 352-359. [Namazova I.K., Smailova G.T., Medzhidova S.R., Salmanova A.R. Determination of cytokines in blood serum and in anterior chamber moisture in pseudoexfoliative syndrome and cataract. *Uspekhi gerontologii = Advances in Gerontology*, 2020, Vol. 33, no. 2, pp. 352-359. (In Russ.)]

7. Попова Е.В. Психосоциальный статус пожилых пациентов с катарактой // Научные результаты биомедицинских исследований, 2020. Т. 6, № 4. С. 538-545. [Popova E.V. Psychoemotional status of elderly patients with cataracts. *Nauchnye rezultaty biomeditsinskikh issledovaniy = Scientific Results of Biomedical Research*, 2020, Vol. 6, no. 4, pp. 538-545. (In Russ.)]

8. Созуракова Е.А., Громакина Е.В., Шабалдин А.В., Штернис Т.А., Седова Д.Ю., Третьяк Е.А., Шигарева С.О. Оценка роли иммунорегуляторного потенциала в ограничении локального воспаления в передней камере глаза (на примере пресениальной катаракты) // Современные проблемы науки и образования, 2019. № 2. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=28677>. [Sosurakova E.A., Gromakina E.V., Shabaldin A.V., Shternis T.A., Sedova D.Yu., Tretyak E.A., Shchigareva S.O. Assessment of the role of immunoregulatory potential in limiting local inflammation in the anterior chamber of the eye (on the example of presenial cataract). *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya = Modern Problems of Science and Education*, 2019, no. 2. [Electronic resource]. Access mode: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=28677>. (In Russ.)]

9. Brinkman C.J., Broekhuysen R.M. Cell mediated immunity in relation to cataract and cataract surgery. *Br. J. Ophthalmol.*, 1979, Vol. 63, no. 5, pp. 301-305.

10. Burton M.J., Ramke J., Marques A.P., Bourne R.R.A., Congdon N., Jones I., Ah Tong B.A.M., Arunga S., Bachani D., Bascaran C., Bastawrous A., Blanchard K., Braithwaite T., Buchan J.C., Cairns J., Cama A., Chagunda M., Chuluunkhuu C., Cooper A., Crofts-Lawrence J., Dean W.H., Denniston A.K., Ehrlich J.R., Emerson P.M., Evans J.R., Frick K.D., Friedman D.S., Furtado J.M., Gichangi M.M., Gichuhi S., Gilbert S.S., Gurung R., Habtamu E., Holland P., Jonas J.B., Keane P.A., Keay L., Khanna R.C., Khaw P.T., Kuper H., Kyari F., Lansingh V.C., Mactaggart I., Mafwiri M.M., Mathenge W., McCormick I., Morjaria P., Mowatt L., Muirhead D., Murthy G.V.S., Mwangi N., Patel D.B., Peto T., Qureshi B.M., Salomão S.R., Sarah V., Shilio B.R., Solomon A.W., Swenor B.K., Taylor H.R., Wang N., Webson A., West S.K., Wong T.Y., Wormald R., Yasmin S., Yusufu M., Silva J.C., Resnikoff S., Ravilla T., Gilbert C.E., Foster A., Faal H.B. The Lancet Global Health Commission on Global Eye Health: vision beyond 2020. *Lancet Glob. Health*, 2021, Vol. 9, no. 4, pp. e489-e551.

11. Glick P., Luoto J., Orrs M.S., Oliva M.S., Tabin G.C., Sanders D.S., Thomas B.J., Ruit S., Belachew T., Tasfaw A.K. The individual and household impacts of cataract surgery on older blind adults in Ethiopia. *Ophthalmic Epidemiol.*, 2019, Vol. 26, no. 1, pp. 7-18.

12. Jiang S., Kametani M., Chen D.F. Adaptive immunity: new aspects of pathogenesis underlying neurodegeneration in glaucoma and optic neuropathy. *Front. Immunol.*, 2020, no. 11, 65. doi: 10.3389/fimmu.2020.00065.

13. Kincses E., Torok M. Study on cellular immune response after complicated cataract operations and in sympathetic ophthalmia. *Albrecht von Graefes Arch. Klin. Exp. Ophthalmol.*, 1977, Vol. 204, no. 2, pp. 149-152.

14. Nakanjako D., Otiti-Sengeri J., Ssewanyana I., Nabatanzi R., Bayigga L., Kirimunda S., Joloba M., Manabe Y.C., Kambugu A., Colebunders R., Mayanja-Kizza H. CD4 T-cell activation and reduced regulatory T-cell populations are associated with early development of cataracts among HIV-infected adults in Uganda. *Immunol. Lett.*, 2014, Vol. 161, no. 1, pp. 44-49.

15. Ramke J., Kyari F., Piyasena M., Murthy G., Gilbert C.E. Cataract services are leaving widows behind: examples from national cross-sectional surveys in Nigeria and Sri Lanka. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 2019, Vol. 16, no. 20, 3854. doi: 10.3390/ijerph16203854.

16. Yang X., Pan X., Zhao X., Luo J., Xu M., Bai D., Hu Y., Liu X., Yu Q., Gao D. Autophagy and age-related eye diseases. *Biomed Res. Int.*, 2019, Vol. 2019, 5763658. doi: 10.1155/2019/5763658.

Авторы:

Османов Р.Э. — к.м.н., врач-офтальмолог Тамбовского филиала ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» имени академика С.Н. Федорова» Министерства здравоохранения РФ, г. Тамбов, Россия

Фабрикантов О.Л. — д.м.н., профессор, директор Тамбовского филиала ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» имени академика С.Н. Федорова» Министерства здравоохранения РФ, г. Тамбов, Россия

Authors:

Osmanov R.E., PhD (Medicine), Ophthalmologist, S. Fyodorov Eye Microsurgery Federal State Institution, Tambov Branch, Tambov, Russian Federation

Fabrikantov O.L., PhD, MD (Medicine), Professor, Director, S. Fyodorov Eye Microsurgery Federal State Institution, Tambov Branch, Tambov, Russian Federation

Поступила 13.12.2021

Принята к печати 05.01.2022

Received 13.12.2021

Accepted 05.01.2022

ОСОБЕННОСТИ СИСТЕМЫ КОМПЛЕМЕНТА ПРИ ПЕРВИЧНОЙ ОТКРЫТОУГОЛЬНОЙ ГЛАУКОМЕ И СИНДРОМЕ СУХОГО ГЛАЗА У ПОЖИЛЫХ

Агарков Н.М.^{1,2}, Фабрикантов О.Л.³, Лев И.В.^{2,3}, Николашин С.И.³,
Аксенов В.В.¹

¹ ФГБОУ ВО «Юго-Западный государственный университет», г. Курск, Россия

² ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет», г. Белгород, Россия

³ Тамбовский филиал ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» имени академика С.Н. Федорова» Министерства здравоохранения РФ, г. Тамбов, Россия

Резюме. Ведущей причиной необратимой слепоты в настоящее время выступает первичная открытоугольная глаукома, сочетающаяся с синдромом сухого глаза, в отношении которых практически неизученной остается система комплемента. Цель исследования — изучение особенностей системы комплемента при первичной открытоугольной глаукоме и синдроме сухого глаза у пожилых. Исследование проводилось на базе Тамбовского филиала МНТК «Микрохирургия глаза им. акад. С.Н. Федорова» у 62 пациентов 60–74 лет с первичной открытоугольной глаукомой и синдромом сухого глаза и 33 пациентов с отсутствием этой патологии. Система комплемента крови изучена гемолитическим методом и иммуноферментным анализом, а С1-ингибитор — хромогенным методом. Для оценки вклада компонентов системы комплемента в развитие вышеуказанной сочетанной офтальмопатологии рассчитывалось отношение шансов по общепринятой методике. Особенности системы комплемента крови у пожилых пациентов с сочетанной первичной открытоугольной глаукомой и синдромом сухого глаза являются прежде всего высокий уровень С3а компонента до $106,2 \pm 3,9$ нг/мл, повышенное содержание С5а компонента до $4,5 \pm 0,2$ нг/мл и фактора Н до $215,9 \pm 5,2$ мкг/мл, снижение С1-ингибитора до $168,4 \pm 6,1$ мкг/мл. В группе возрастного контроля содержание вышеуказанных компонентов системы комплемента в плазме крови соответственно составило $45,2 \pm 4,0$ нг/мл, $3,1 \pm 0,2$ нг/мл, $141,5 \pm 4,3$ мкг/мл, $237,9 \pm 5,8$ мкг/мл с достоверным различием во всех случаях. Важная патогенетическая роль С3а, С5а, фактора Н и С1-ингибитора крови в развитии сочетанной первичной открытоугольной глаукомы с синдромом сухого глаза подтверждается полученными величинами отношения шансов с максимальным значением для С3а компонента, составившем 4,035 с доверительным интервалом 3,640–4,283 ($p < 0,0001$), что указывает на повышение риска развития рассматриваемой сочетанной офтальмопатологии в пожилом возрасте в 4,035 раза. Высокие величины отношения шансов характерны также для С5а (2,946; ДИ 2,618–3,547), С3 (2,821; ДИ 2,453–3,264), фактора Н (2,765; ДИ 2,431–3,148). Изменения других изученных компонентов системы комплемента крови и их влияние на формирование первичной открытоугольной глаукомы при сочетании с синдромом

Адрес для переписки:

Агарков Николай Михайлович
ФГБОУ ВО «Юго-Западный государственный университет»
305040, Россия, г. Курск, ул. 50 лет Октября, 94.
Тел.: 8 (910) 740-96-13.
E-mail: vitalaxen@mail.ru

Address for correspondence:

Agarkov Nikolai M.
South-Western State University
300540, Russian Federation, Kursk, 50 let Oktyabrya str., 94.
Phone: 7 (910) 740-96-13.
E-mail: vitalaxen@mail.ru

Образец цитирования:

Н.М. Агарков, О.Л. Фабрикантов, И.В. Лев, С.И. Николашин, В.В. Аксенов «Особенности системы комплемента при первичной открытоугольной глаукоме и синдроме сухого глаза у пожилых» // Медицинская иммунология, 2022. Т. 24, № 2. С. 301-308. doi: 10.15789/1563-0625-FOT-2394
© Агарков Н.М. и соавт., 2022

For citation:

N.M. Agarkov, O.L. Fabrikantov, I.V. Lev, S.I. Nikolashin, V.V. Aksenov "Features of the complement system in primary open-angle glaucoma and dry eye syndrome in the elderly", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2022, Vol. 24, no. 2, pp. 301-308. doi: 10.15789/1563-0625-FOT-2394
DOI: 10.15789/1563-0625-FOT-2394

сухого глаза в пожилом возрасте менее существенны. Это указывает, что развитие первичной открытоугольной глаукомы, сочетанной с синдромом сухого глаза, происходит на фоне активации указанных компонентов системы комплемента. Выявленные особенности системы комплемента позволяют эффективнее осуществлять диагностику данных сочетанных офтальмологических заболеваний.

Ключевые слова: система комплемента, первичная открытоугольная глаукома, синдром сухого глаза, пожилые

FEATURES OF THE COMPLEMENT SYSTEM IN PRIMARY OPEN-ANGLE GLAUCOMA AND DRY EYE SYNDROME IN THE ELDERLY

Agarkov N.M.^{a, b}, Fabrikantov O.L.^c, Lev I.V.^{b, c}, Nikolashin S.I.^c,
Aksenov V.V.^a

^a South-Western State University, Kursk, Russian Federation

^b Belgorod National Research University, Belgorod, Russian Federation

^c S. Fyodorov Eye Microsurgery Federal State Institution, Tambov Branch, Tambov, Russian Federation

Abstract. Primary open-angle glaucoma combined with dry eye syndrome is the leading cause of irreversible blindness. Complement system remains nearly unexplored in this disorder. The aim of our study was to evaluate the parameters of complement system in primary open-angle glaucoma and dry eye syndrome among elderly persons. The study was conducted at the S. Fedorov Center of Eye Microsurgery (Tambov Branch), and enrolled 62 patients aged 60 to 74 years with primary open-angle glaucoma combined with dry eye syndrome, and 33 patients free of this pathology. The blood complement system was studied by hemolytic method and enzyme immunoassay, and the C1 inhibitor was studied by chromogenic method. To assess possible contribution of the complement system components to the mentioned eye disorder, appropriate odds ratios were calculated, according to the generally accepted method. The study of blood complement system in elderly patients with combined primary open-angle glaucoma and dry eye syndrome have shown, first of all, high C3a level (up to 106.2 ± 3.9 ng/ml), increased contents of C5a (4.5 ± 0.2 ng/ml), and factor H (215.9 ± 5.2 mcg/ml), along with decreased C1 inhibitor (to 168.4 ± 6.1 mcg/ml). In the age-matched control group, the contents of appropriate plasma complement factors were, respectively, 45.2 ± 4.0 ng/ml; 3.1 ± 0.2 ng/ml; 141.5 ± 4.3 mcg/ml; 237.9 ± 5.8 mcg/ml, showing significant difference for all these parameters. An important pathogenetic role of C3a component, C5a component, factor H, and the C1 inhibitor in development of combined primary open-angle glaucoma with dry eye syndrome was confirmed by the values of odds ratio (OR) with maximum value for the C3a component (OR 4.035, CI 3.640–4.283, $p < 0.0001$), which indicates increased risk of developing the mentioned ophthalmopathy in old age. High odd ratios were also characteristic of C5a blood components (2.946; CI 2.618–3.547), C3 (2.821; CI 2.453–3.264), factor H (2.765; CI 2.431–3.148). Less significant changes were revealed for other complement components thus suggesting only marginal association with development of primary open-angle glaucoma with dry eye syndrome in old age. This indicates that the development of primary open-angle glaucoma with dry eye syndrome is associated with activation of these factors of the complement system. The revealed features of the complement system will enable us for more effective diagnostics of these combined eye disorders.

Keywords: complement system, primary open-angle glaucoma, dry eye syndrome, elderly

Введение

Глаукома представляет глобальную и неудовлетворительно изученную и решенную медицинскую проблему и патологию современности, сопровождающуюся нейродегенеративными процессами, которые непрерывно повреждают зри-

тельный нерв и ганглиозные клетки сетчатки, вызывая необратимую слепоту [12]. Глаукома затрагивает в современном мире более 70 миллионов человек [9]. и тенденция к увеличению заболеваемости взрослого и пожилого населения сохранится в будущем с доминированием пер-

вичной открытоугольной глаукомы, занимающей от 75% до 90% всех форм глаукомы [5, 11].

Современные терапевтические воздействия при первичной открытоугольной глаукоме нацелены исключительно на снижение внутриглазного давления, считающимся одним из основных факторов риска заболевания. Однако повышенное внутриглазное давление не является ни необходимым, ни достаточным условием, вызывающим развитие глаукомы [12], поскольку гибель ганглиозных клеток сетчатки наблюдается и у людей с нормальным внутриглазным давлением. Недавние исследования выявили доказательства, указывающие на связь между повышенным внутриглазным давлением и иммунологическими реакциями, в том числе с адаптивным иммунитетом, способствующим прогрессивному повреждению зрительного нерва при первичной открытоугольной глаукоме. Среди иммунологических факторов развития первичной открытоугольной глаукомы особое внимание уделяется интерлейкинам как на системном, так и местном уровнях [2, 7], но практически неизученной остается система компонентов комплемента при изолированной первичной открытоугольной глаукоме, сочетанной с синдромом сухого глаза, участие которой активно обсуждается в патогенезе возрастной макулярной дегенерации [1, 4].

Цель исследования — изучение особенностей системы комплемента при первичной открытоугольной глаукоме и синдроме сухого глаза у пожилых.

Материалы и методы

Под наблюдением находилось 62 пациента в возрасте от 60 до 74 лет (средний возраст $69,7 \pm 2,1$ лет), страдающих сочетанной первичной открытоугольной глаукомой и синдромом сухого глаза, проходивших обследование и лечение в 2018–2019 гг. в Тамбовском филиале МНТК «Микрохирургия глаза им. акад. С.Н. Федорова» (основная группа). Диагностика первичной открытоугольной глаукомы и синдрома сухого глаза осуществлялись на основе комплексного офтальмологического обследования, включающего измерение внутриглазного давления с помощью бесконтактного пневмотонометра Reichert 7 CR (США), визиометрию посредством автоматического фороптера RT-5100 (Nidek, Япония), определение остроты зрения на проекторе оптометров Reichert (США) с набором корректируемых линз, изучение световой чувствительности посредством аутоанализатора Humphrey-620 (Германия). Критерии диагноза соответствовали «Национальному руководству по глаукоме» [6].

Контрольную группу составили 33 пациента в возрасте от 60 до 74 лет (средний возраст $68,4 \pm 2,3$ лет), не имеющих офтальмологических заболеваний, отсутствие которых установлено после аналогичного офтальмологического обследования пациентов основной группы.

Изучение компонентов системы комплемента в плазме крови осуществлялось с помощью гемолитического метода и иммуноферментного анализа. По способности ингибировать С1-эстеразу оценивали активность С1-ингибитора на основе хромогенного метода.

Отношение шансов (ОШ) компонентов системы комплемента рассчитывали по общепринятой формуле: $ОШ = (a \times d) / (b \times c)$, где a — наличие данного показателя в основной группе, b — отсутствие этого показателя в основной группе, c — наличие показателя в контрольной группе, d — отсутствие этого показателя в контрольной группе [3]. Для оценки достоверности полученных величин ОШ определялись доверительные интервалы с конкретной ошибкой для доверительных интервалов. Статистическая обработка результатов исследования определялась по стандартной программе Statistica 10.0 с использованием непараметрического критерия χ^2 .

При проведении исследования соблюдались стандарты надлежащей клинической практики “Good Clinical Practice” и принципы Хельсинкской декларации.

Результаты

Изучение содержания компонентов системы комплемента в плазме крови пациентов, страдающих первичной открытоугольной глаукомой в сочетании с синдромом сухого глаза, выявило по сравнению с пациентами аналогичного возраста без офтальмологической патологии, преимущественно повышение большинства из них (табл. 1).

Особенно существенно различается в сравниваемых группах больных уровень С3а компонента комплемента, который в 2,5 раза у пациентов с первичной открытоугольной глаукомой и синдромом сухого глаза превышает среднее значение в контрольной группе со статистически значимой разницей ($p < 0,001$). При развитии сочетанной офтальмологической патологии на системном уровне произошло существенное увеличение содержания других компонентов комплемента — С5а и фактора Н. Следует также указать на статистически достоверное увеличение в плазме крови пациентов основной группы С3 компонента и С4 компонента системы комплемента ($p < 0,001$). Вместе с тем развитие первичной открытоуголь-

ТАБЛИЦА 1. УРОВЕНЬ КОМПОНЕНТОВ СИСТЕМЫ КОМПЛЕМЕНТА В ПЛАЗМЕ КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С ПЕРВИЧНОЙ ОТКРЫТОУГОЛЬНОЙ ГЛАУКОМОЙ, СИНДРОМОМ СУХОГО ГЛАЗА И В КОНТРОЛЬНОЙ ГРУППЕ, $M \pm m$

TABLE 1. LEVEL OF COMPONENTS OF THE COMPLEMENT SYSTEM IN THE BLOOD PLASMA OF PATIENTS WITH PRIMARY OPEN-ANGLE GLAUCOMA, DRY EYE SYNDROME AND IN THE CONTROL GROUP, $M \pm m$

Компоненты системы комплемента, единица измерения Complement system components, unit of measurement	Пациенты с первичной открытоугольной глаукомой и синдромом сухого глаза Patients with primary open-angle glaucoma and dry eye syndrome (n = 62)	Контрольная группа Control group (n = 33)	p
С3, мг/дл C3, mg/dl	83,0 $\pm$ 4,2	59,4 $\pm$ 2,6	< 0,001
С3а, нг/мл C3a, ng/ml	106,2 $\pm$ 3,9	45,2 $\pm$ 4,0	< 0,001
С4, мг/дл C4, mg/dl	27,8 $\pm$ 2,1	19,8 $\pm$ 1,5	< 0,001
С5, мг/мл C5, mg/ml	31,3 $\pm$ 2,4	29,3 $\pm$ 1,9	> 0,05
С5а, нг/мл C5a, ng/ml	4,5 $\pm$ 0,2	3,1 $\pm$ 0,2	< 0,001
С1-инг., мкг/мл C1 ing., mkg/ml	168,4 $\pm$ 6,1	237,9 $\pm$ 5,8	< 0,001
Фактор Н, мкг/мл Factor H, mkg/ml	215,2 $\pm$ 5,2	141,5 $\pm$ 4,3	< 0,001

ной глаукомы и синдрома сухого глаза не оказывает существенного влияния на уровень С5 компонента системы комплемента ($p > 0,05$).

Следовательно, активация системы комплемента, являющейся важной составляющей врожденного и приобретенного иммунитета, у пациентов с сочетанной первичной открытоугольной глаукомой и синдромом сухого глаза свидетельствует об участии большинства отдельных компонентов в развитии обсуждаемой офтальмологической патологии и особенно С3а компонента, С5а компонента и фактора Н.

Выполненные в дальнейшем расчеты отношения шансов показывают, что потенциально максимальный риск развития первичной открытоугольной глаукомы в сочетании с синдромом сухого глаза ассоциирован с С3а компонентом системы комплемента (табл. 2).

Высокая величина отношения шансов для развития данных офтальмологических заболеваний среди изученных компонентов системы комплемента крови характерна для С5а компонента, повышение которой в плазме крови более 4,5 $\pm$ 0,2 нг/мл увеличивает риск развития патологии в 2,964 раза. Высоким риском в развитии первичной открытоугольной глаукомы в сочетании с синдромом сухого глаза обладают так-

же С3 компонент и фактор Н. При этом степень риска, связанная с данными факторами системы комплемента, приблизительно одинакова. Доверительные интервалы для рассмотренных факторов системы комплемента статистически значимы. Вклад С4 компонента и С1-инг. системы комплемента в развитие сочетанной первичной открытоугольной глаукомы с синдромом сухого глаза в пожилом возрасте существенно ниже, чем вышеуказанных компонентов. Доверительный интервал для отношения шансов С5 компонента системы комплемента является недостоверным.

Обсуждение

При изолированной первичной открытоугольной глаукоме в последние годы среди более молодых пациентов от 17 до 69 лет, в отличие от обследованных нами больных 60-74 лет с сочетанной первичной открытоугольной глаукомой и синдромом сухого глаза, показано, что уровень С3 компонента системы комплемента в сыворотке крови составлял 95,63 $\pm$ 17,71 мг/дл или на 20,93% ниже, чем в контрольной группе – 115,65 $\pm$ 22,19 мг/дл ($p < 0,001$) [13]. Аналогичный результат наблюдается при сравнении сывороточных уровней С3 компонента между пациентами с первичной открытоугольной гла-

ТАБЛИЦА 2. ОТНОШЕНИЕ ШАНСОВ ДЛЯ ИССЛЕДОВАННЫХ КОМПОНЕНТОВ СИСТЕМЫ КОМПЛЕМЕНТА К ПЛАЗМЕ КРОВИ У ПАЦИЕНТОВ С ПЕРВИЧНОЙ ОТКРЫТОУГОЛЬНОЙ ГЛАУКОМОЙ

TABLE 2. RATIO OF ODDS FOR THE STUDIED COMPONENTS OF THE COMPLEMENTARITY SYSTEM TO BLOOD PLASMA IN PATIENTS WITH PRIMARY OPEN-ANGLE GLAUCOMA

Компоненты системы комплемента, единица измерения Complement system components, unit of measurement	Отношение шансов Odds ratio	Доверительный интервал Confidence interval	p
С3, мг/дл C3, mg/dl	2,821	2,453-3,264	< 0,0002
С3а, нг/мл C3a, ng/ml	4,035	3,640-4,283	< 0,0001
С4, мг/дл C4, mg/dl	2,342	2,106-2,847	< 0,0021
С5, мг/мл C5, mg/ml	1,121	0,815-1,434	< 0,0682
С5а, нг/мл C5a, ng/ml	2,946	2,618-3,547	< 0,0036
С1-инг., мкг/мл C1 ing., mkg/ml	2,204	1,928-2,619	< 0,0052
Фактор Н, мкг/мл Factor H, mkg/ml	2,765	2,431-3,148	< 0,0031

укомой и контрольной группой в зависимости от возраста и пола. Средний уровень С3 компонента в сыворотке крови был самым низким в группе с тяжелой первичной открытоугольной глаукомой ($85,18 \pm 19,62$ мг/дл), за которой следовали группа с умеренной ($96,62 \pm 12,63$ мг/дл) и группа с легкой глаукомой ($110,44 \pm 14,89$ мг/дл) ($p < 0,001$). Установлена также ассоциация между содержанием С3 компонента в сыворотке крови с тяжестью первичной открытоугольной глаукомы (ОШ = 0,939, доверительный интервал -0,901-0,979), что, по мнению авторов [13, 14], свидетельствует о вовлечении С3 компонента системы комплемента в патогенез изолированной первичной открытоугольной глаукомы.

Патогенетическая роль С3 компонента системы комплемента в развитии изолированной аутоиммунной глаукомы доказана и в экспериментальных исследованиях на крысах в ходе готовых выявлено ее повышение в сетчатке на 14-е сутки после иммунизации. Одновременно установлено увеличение содержания интерлейкина в слезной жидкости на 7-е сутки.

В экспериментальной модели аутоиммунной глаукомы у крыс отмечена ранняя активация С5 компонента системы комплемента, еще до дегенерации зрительного нерва [10]. Введение же

интравитреально в один глаз животных антител против С5 компонента приводило через 6 недель терапии к снижению ее содержания. Обнаруженное авторами ингибирование С5 компонента системы комплемента предотвращало повреждение зрительного нерва в модели аутоиммунной глаукомы. В исследованиях этих же авторов [15] в экспериментальной модели аутоиммунной глаукомы обобщены результаты об изменении в сыворотке С3 и С5 компонентов системы комплемента, которые существенно снизились после интравитреального введения антител, что способствовало, по данным спектрально-доменной оптической когерентной томографии, электро-ретинограммы, предотвращению потери функции сетчатки и прогрессирования аутоиммунной глаукомы. В других исследованиях также показаны актуальность и потенциал стратегии ингибирования системы комплемента для элиминации поражения зрительной системы при глаукоме [8], но об изучении широкого комплекса компонентов системы комплемента при сочетанной первичной открытоугольной глаукоме с синдромом сухого глаза не сообщается. Нами проведен анализ изменений содержания не только различных компонентов системы комплемента в плазме крови пожилых пациентов с указанной сочетан-

ной офтальмопатологией, но и фактора Н, который остается практически неизученным. Кроме того, в нашем исследовании определены потенциальные риски компонентов системы комплемента в развитии сочетанной первичной открытоугольной глаукомы с синдромом сухого глаза. Рассмотренные экспериментальные исследования, в отличие от нашей клинической работы, нуждаются в апробации и подтверждении в клинических условиях.

Заключение

Особенностями системы комплемента крови пожилых пациентов с первичной открытоугольной глаукомой, сочетанной с синдромом сухого

глаза, является активация большинства компонентов, сопровождающаяся прежде всего высоким уровнем С3а компонента, повышением содержания С5а компонента и фактора Н на фоне снижения экспрессии С1-ингибитора. Высокий риск развития рассматриваемых офтальмологических заболеваний, согласно величинам отношения шансов, связан с С3а, С5а, С3 и фактором Н системы комплемента. Выявленная специфика системы комплемента у больных с сочетанной первичной открытоугольной глаукомой и синдромом сухого глаза позволит эффективнее осуществлять диагностику этих нозологий.

Финансирование

Исследование не имело спонсорской поддержки.

Список литературы / References

1. Абдуллаева Э.А. Роль системы комплемента и других воспалительных факторов в развитии возрастной макулярной дегенерации // Казанский медицинский журнал, 2018. Т. 99, № 4. С. 657-664. [Abdullayeva E.A. The role of the complement system and other inflammatory factors in the development of age-related macular degeneration. *Kazanskiy meditsinskiy zhurnal = Kazan Medical Journal*, 2018, Vol. 99, no. 4, pp. 657-664. (In Russ.)]
2. Агарков Н.М., Чухраев А.М., Яблокова Н.В. Диагностика и прогнозирование первичной открытоугольной глаукомы по уровню местных цитокинов // Медицинская иммунология, 2019. Т. 21, № 6. С. 1163-1168. [Agarkov N.M., Chukhraev A.M., Yablokova N.V. Diagnosis and prognosis of primary open-angle glaucoma by the level of local cytokines. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2019, Vol. 21, no. 6, pp. 1163-1168. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2019-6-1163-1168.
3. Айвазян С.А., Мхитарян В.С. Теория вероятностей и прикладная статистика. М.: Юнити-Дана, 2001. 656 с. [Aivazyan S.A., Mkhitaryan V.S. Probability theory and applied statistics]. Moscow: Unity-Dana, 2001. 656 p.
4. Коняев Д.А. Взаимосвязь показателей интерлейкинового профиля и оксидантной системы крови у пожилых больных возрастной макулярной дегенерацией с поздней стадией // Научные результаты биомедицинских исследований, 2020, Т. 6, № 1. С. 118-125. [Konyaev D.A. The relationship between the interleukin profile and the blood oxidant system in elderly patients with late-stage age-related macular degeneration. *Nauchnye rezultaty biomeditsinskikh issledovaniy = Scientific Results of Biomedical Research*, 2020, Vol. 6, no. 1, pp. 118-125. (In Russ.)]
5. Лихванцева В.Г., Соколов В.А., Леванова О.Н., Ковеленова И.В. Прогнозирование вероятности развития и прогрессирования первичной открытоугольной глаукомы методом регрессионного моделирования // Вестник офтальмологии, 2018. Т. 134, № 3. С. 35-41. [Likhvantseva V.G., Sokolov V.A., Levanova O.N., Kovelenova I.V. Prediction of the probability of development and progression of primary open-angle glaucoma by regression modeling. *Vestnik oftalmologii = Bulletin of Ophthalmology*, 2018, Vol. 134, no. 3, pp. 35-41. (In Russ.)]
6. Нестеров А.П., Алексеев В.Н., Алексеев И.Б. Национальное руководство по глаукоме для практикующих врачей. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2015. 457 с. [Nesterov A.P., Alekseev V.N., Alekseev I.B. National guide to glaucoma for practicing physicians]. Moscow: GEOTAR-Media, 2015. 457 p.
7. Чухраев А.М., Агарков Н.М., Коняев Д.А., Попова Е.В., Яблоков М.М. Информативность интерлейкинов слезной жидкости в диагностике и развитии закрытоугольной глаукомы в пожилом возрасте // Инфекция и иммунитет, 2020. Т. 10, № 4. С. 755-761. [Chukhraev A.M., Agarkov N.M., Konyaev D.A., Popova E.V., Yablokov M.M. Informativeness of lacrimal fluid interleukins in the diagnosis and development of angle-closure glaucoma in the elderly. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2020, Vol. 10, no. 4, pp. 755-761. (In Russ.)]. doi: 0.15789/2220-7619-IIT-1247.
8. Borucki D.M., Toutonji A., Couch C., Mallah K., Rohrer B., Tomlinson S. Complement-mediated microglial phagocytosis and pathological changes in the development and degeneration of the visual system. *Front. Immunol.*, 2020, Vol. 11, 566892. doi: 10.3389/fimmu.2020.566892.

9. Buffault J., Graber M., Bensmail D., Bluwol É., Jeanteur M.-N., Abitbol O., Benhatchi N., Sauvan L., Lachkar Y. Efficacy and safety at 6 months of the XEN implant for the management of open angle glaucoma. *Sci. Rep.*, 2020, Vol. 10, no. 1, 4527. doi: 10.1038/s41598-020-61319-1.
10. Gassel C.J., Reinerh S., Gomes S.C., Dick H.B., Joachim S.C. Preservation of optic nerve structure by complement inhibition in experimental glaucoma. *Cell Tissue Res*, 2020, Vol. 382, no. 2, pp. 293-306.
11. Jeon S.J., Jung Y., Jung C.B., Park H.-Y.L., Park C.K.. Visual function evaluation for low vision patients with advanced glaucoma. *Medicine (Baltimore)*, 2020, Vol. 99, no. 7, e19149. doi: 10.1097/MD.00000000000019149.
12. Jiang S., Kametani M., Chen D.J. Adaptive immunity: new aspects of pathogenesis underlying neurodegeneration in glaucoma and optic neuropathy. *Front. Immunol.*, 2020, Vol. 11, 65. doi: 10.3389/fimmu.2020.00065.
13. Li S., Li D., Shao M., Cao W., Sun X. Decreased serum levels of complement C3 reflect complement system dysregulation in patients with primary open-angle glaucoma: results from a pilot study. *J. Glaucoma*, 2018, Vol. 27, no. 9, pp. 761-768.
14. Reinehr S., Reinhard J., Gandej M., Gottschalk I., Stute G., Faissner A., Dick H.B., Joachim S.C. S100B immunization triggers NFκB and complement activation in an autoimmune glaucoma model. *Sci. Rep.*, 2018, Vol. 8, no. 1, 9821. doi: 10.1038/s41598-018-28183-6.
15. Reinehr S., Gomes S.C., Gassel C.J., Asaad M.A., Stute G., Schargus M., Dick H.B., Joachim S.C. Intravitreal therapy against the complement factor C5 prevents retinal degeneration in an experimental autoimmune glaucoma model. *Front. Pharmacol.*, 2019, Vol. 10, 1381. doi: 10.3389/fphar.2019.01381.

Авторы:

Агарков Н.М. — д.м.н., профессор кафедры биомедицинской инженерии ФГБОУ ВО «Юго-Западный государственный университет» Министерства образования и науки РФ, г. Курск; старший научный сотрудник лаборатории «Проблемы старения» ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет», г. Белгород, Россия

Фабрикантов О.Л. — д.м.н., профессор, директор Тамбовского филиала ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» имени академика С.Н. Федорова» Министерства здравоохранения РФ, г. Тамбов, Россия

Authors:

Agarkov N.M., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Biomedical Engineering, South-Western State University, Kursk; Senior Research Associate, Laboratory "Problems of Aging", Belgorod National Research University, Belgorod, Russian Federation

Fabrikantov O.L., PhD, MD (Medicine), Professor, Director, S. Fyodorov Eye Microsurgery Federal State Institution, Tambov Branch, Tambov, Russian Federation

Лев И.В. — к.м.н., врач-офтальмолог, заведующая
Офтальмологическим отделением Тамбовского
филиала ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза»
имени академика С.Н. Федорова» Министерства
здравоохранения РФ, г. Тамбов; заведующая
Офтальмологическим отделением ФГАОУ ВО
«Белгородский государственный национальный
исследовательский университет», г. Белгород, Россия

Николашин С.И. — к.м.н., врач высшей категории,
заведующий научным отделом Тамбовского филиала
ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза»
имени академика С.Н. Федорова» Министерства
здравоохранения РФ, г. Тамбов, Россия

Аксенов В.В. — заведующий лабораториями кафедры
биомедицинской инженерии ФГБОУ ВО «Юго-Западный
государственный университет» Министерства
образования и науки РФ, г. Курск, Россия

Lev I. V., PhD (Medicine), Ophthalmologist, Head, First
Ophthalmological Department, S. Fyodorov Eye Microsurgery
Federal State Institution, Tambov Branch, Tambov; Head,
I Ophthalmology Department, Belgorod National Research
University, Belgorod, Russian Federation

Nikolashin S.I., PhD (Medicine), Head, Scientific
Department, S. Fyodorov Eye Microsurgery Federal State
Institution, Tambov Branch, Tambov, Russian Federation

Aksenov V.V., Head of Laboratories, Department of Biomedical
Engineering, South-Western State University, Kursk, Russian
Federation

Поступила 12.08.2021
Принята к печати 07.11.2021

Received 12.08.2021
Accepted 07.11.2021

СИСТЕМНЫЙ ИНТЕРЛЕЙКИНОВЫЙ ПРОФИЛЬ ПАЦИЕНТОВ ПОЖИЛОГО ВОЗРАСТА С КАТАРАКТОЙ, СОЧЕТАННОЙ С СИНДРОМОМ СТАРЧЕСКОЙ АСТЕНИИ

Фабрикантов О.Л., Османов Р.Э.

Тамбовский филиал ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» имени академика С.Н. Федорова»
Министерства здравоохранения РФ, г. Тамбов, Россия

Резюме. Нарушения в иммунной системе организма играют важную роль в развитии не только возраст-ассоциированных офтальмологических заболеваний (катаракта, возрастная макулярная дегенерация), но и гериатрических состояний и, прежде всего, – синдрома старческой астении – ведущего дефицитарного синдрома среди людей старших возрастных групп. Однако изменения системных интерлейкинов у пациентов с одновременным наличием двух возраст-ассоциированных состояний – катаракты и синдрома старческой астении практически не изучены. Цель исследования – изучение системного интерлейкинового профиля у пациентов пожилого возраста с катарактой, сочетанной с различными стадиями синдрома старческой астении. Содержание интерлейкинов в сыворотке крови анализировалось в клинических условиях среди пациентов с изолированной катарактой ($n = 58$), с катарактой и старческой преастенией ($n = 49$), с катарактой и синдромом старческой астении ($n = 56$) в возрасте от 60 до 74 лет во всех группах. Диагноз синдрома старческой астении устанавливался в соответствии с показателями фенотипической модели Fried L. и соавт., а катаракты – по результатам комплексного офтальмологического обследования. Определение IL-1, IL-1 β , IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-17 и IL-18 выполнено иммуноферментным анализом с расчетом относительного риска для каждого вышеуказанного интерлейкина по общепринятой методике. Установлено статистически значимое повышение у пациентов с катарактой и старческой преастенией IL-1, IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-13 и снижение IL-4, IL-10 по сравнению с больными, страдающими только катарактой. Среди пациентов с катарактой и синдромом старческой астении диагностированы нарушения по большему числу интерлейкинов с повышением IL-1, IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-9, IL-12, IL-13, IL-17, IL-18 и со снижением IL-4, IL-10 по сравнению как с пациентами с изолированной катарактой, так и с катарактой, сочетанной со старческой преастенией. Достоверные величины относительного риска при катаракте и старческой преастении выявлены для IL-1 (1,27), IL-1 β (1,20), IL-4 (1,21), IL-6 (1,19), IL-8 (1,93), IL-10 (2,15) и IL-13 (1,23), а при катаракте и синдроме старческой астении – для IL-1 (1,45), IL-1 β (1,31), IL-4 (1,38), IL-6 (1,57), IL-8 (2,86), IL-10 (2,39), IL-13 (1,39), IL-17 (1,27). Полученные результаты свидетельствуют о более выраженных изменениях вышеуказанных системных интерлейкинов и большей их ассоциации у пациентов 60–74 лет с катарактой, сочетанной с синдромом старческой астении, чем при катаракте и старческой преастении.

Ключевые слова: интерлейкины крови, катаракта, синдром старческой астении, старческая преастения, пожилые

Адрес для переписки:

Османов Руслан Эседуллаевич
Тамбовский филиал ФГАУ «НМИЦ «МНТК
«Микрохирургия глаза» имени академика С.Н. Федорова»
Министерства здравоохранения РФ
392000, Россия, г. Тамбов, Рассказовское шоссе, 1.
Тел.: 8 (910) 740-96-13.
E-mail: vitalaxen@mail.ru

Address for correspondence:

Osmanov Ruslan E
S. Fyodorov Eye Microsurgery Federal State Institution,
Tambov Branch
392000, Russian Federation, Tambov,
Rasskazovskoe highway, 1.
Phone: 7 (910) 740-96-13.
E-mail: vitalaxen@mail.ru

Образец цитирования:

О.Л. Фабрикантов, Р.Э. Османов «Системный интерлейкиновый профиль пациентов пожилого возраста с катарактой, сочетанной с синдромом старческой астении» // Медицинская иммунология, 2022. Т. 24, № 2. С. 309-316.
doi: 10.15789/1563-0625-SIP-2464
© Фабрикантов О.Л., Османов Р.Э., 2022

For citation:

O.L. Fabrikantov, R.E. Osmanov "Systemic interleukin profile of elderly patients with cataract combined with senile asthenia syndrome", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2022, Vol. 24, no. 2, pp. 309-316.
doi: 10.15789/1563-0625-SIP-2464
DOI: 10.15789/1563-0625-SIP-2464

SYSTEMIC INTERLEUKIN PROFILE OF ELDERLY PATIENTS WITH CATARACT COMBINED WITH SENILE ASTHENIA SYNDROME

Fabrikantov O.L., Osmanov R.E.

S. Fyodorov Eye Microsurgery Federal State Institution, Tambov Branch, Tambov, Russian Federation

Abstract. Immune disorders play an important role in development of age-related ophthalmic diseases (e.g., cataracts, age-related macular degeneration), as well as in geriatric conditions and, above all, in senile asthenia syndrome, the leading deficiency syndrome among people at their older age. However, the changes in systemic interleukins in patients with simultaneous presence of two age-associated conditions (cataract and senile asthenia syndrome) were only poorly studied. The aim of the present work was to evaluate the systemic interleukin profile in elderly patients affected by cataracts combined with senile asthenia syndrome of different severity. Patients and methods: The contents of interleukins in blood serum was analyzed in a clinical setting among patients aged 60 to 74 years for all the groups which manifested with isolated cataracts ($n = 58$), cataracts and senile preasthenia ($n = 49$), and cataracts and senile asthenia syndrome ($n = 56$). The diagnosis of senile asthenia syndrome was established in accordance with indexes of the phenotypic model by Fried L. et al., and cataracts, according to results of clinical ophthalmological examination. Determination of IL-1, IL-1 β , IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-17 and IL-18 were performed by enzyme immunoassay followed by calculation of relative risk for each of the above interleukin, as generally accepted. Results: A statistically significant increase of IL-1, IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-13 levels, along with decrease in IL-4, IL-10 were shown in the patients presenting with combination of cataract and senile pre-asthenia, as compared with patients with only cataracts. Among the patients with cataracts and senile asthenia syndrome, the disorders were diagnosed for a large number of interleukins, with increased levels of IL-1, IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-9, IL-12, IL-13, IL-17, IL-18, and decreased concentrations of IL-4, IL-10, in comparison with cases of isolated cataract, or cataract combined with senile preasthenia. Significant values of relative risk were revealed for cataract and senile preasthenia, i.e., for IL-1 (1.27), IL-1 β (1.20), IL-4 (1.21), IL-6 (1.19), IL-8 (1.93), IL-10 (2.15) and IL-13 (1.23), and, in cases of cataracts and senile asthenia syndrome, for IL-1 (1.45), IL-1 β (1.31), IL-4 (1.38), IL-6 (1.57), IL-8 (2.86), IL-10 (2.39), IL-13 (1.39), IL-17 (1.27). The results obtained point to marked changes in the mentioned systemic interleukins among the patients aged 60 to 74 years, and more pronounced association of these changes with cataract combined with senile asthenia syndrome, than with cataract and senile preasthenia.

Keywords: blood interleukins, cataracts, senile asthenia syndrome, senile preasthenia, elderly

Введение

Иммунологические нарушения, как известно, способствуют развитию многих офтальмологических заболеваний, вызывающих частичную или полную потерю зрения. Особое значение иммунологические нарушения приобретают в процессе старения и формирования возраст-ассоциированной офтальмологической патологии — возрастной макулярной дегенерации, глаукомы, катаракты, распространенность которой существенно увеличилась во многих странах мира и приобрела характер глобальной проблемы [5]. Известно о повышении абсолютного и относительного количества CD3⁺CD4⁺CD8⁺ лимфоцитов в крови у пациентов с начальной и промежуточной стадиями возрастной макулярной дегенерации и здоровых лиц старшего возраста, что позволяет думать о возможной роли этой субпопуляции в возникновении и прогрессировании названной офтальмопатологии [3].

В ранее выполненном нами исследовании [10] установлено повышение в слезной жидкости уровня провоспалительных IL-2, IL-17, IL-18 и снижение продукции противовоспалительного IL-10 при глаукоме.

В единичных публикациях сообщается об увеличении синтеза провоспалительного IL-1 β и интерферона и поступления их в кровь у пациентов 28-55 лет, страдающих неосложненной пресенильной катарактой [8]. В клеточном звене системного иммунитета у больных с катарактой выявлено снижение Т-лимфоцитов, В-лимфоцитов и натуральных киллеров [4].

В связи с нарушением иммунной регуляции в пожилом и старческом возрасте развиваются не только возраст-ассоциированные болезни глаза, но и синдром старческой астении (ССА), к изучению которого в последние годы наблюдается неуклонный интерес со стороны различных специалистов-геронтологов, иммунологов, семейных врачей. ССА представляет мультифакториаль-

ный синдром, характеризующийся снижением с возрастом физиологического резерва и функций большинства органов и систем, что приводит к повышенной уязвимости пациента в отношении развития зависимости от окружающих, к снижению способности отвечать на внешние и внутренние стрессорные воздействия, а также к неблагоприятным медицинским и социальным последствиям [17]. ССА — это крайнее проявление возрастных изменений, приводящих к инволютивным процессам в организме и к кумуляции разных заболеваний [9]. ССА в соответствии с фенотической моделью Fried L. и соавт. [12] включает пять критериев: потеря массы тела, снижение мышечной силы, выраженная утомляемость и низкий уровень физической активности, которому предшествует старческая преастения (СПА), проявляющаяся частыми периодами обострения, декомпенсации патологии.

Считается, что при отсутствии адекватных мер лечения и реабилитации СПА переходит в ССА в течение 4–5 лет и ключевым фактором, способствующим к формированию ССА выступает дисбаланс иммунной системы [14, 20].

ССА может формироваться одновременно с офтальмологической патологией, в том числе с катарактой, и в развитии этих двух возраст-ассоциированных заболеваний могут наблюдаться общие иммунологические нарушения. Однако изменения системного интерлейкинового статуса у пациентов с катарактой, сочетанной с ССА, практически не изучены, но выявление этих взаимоотношений, позволит, на наш взгляд, снизить негативность проявлений ССА и зрительного дефицита вследствие катаракты.

Цель исследования — изучение системного интерлейкинового профиля у пациентов пожилого возраста с катарактой, сочетанной с различными стадиями ССА.

Материалы и методы

Исследование проведено в 2020–2021 гг. в Тамбовском филиале МНТК «Микрохирургия глаза имени академика С.Н. Федорова» при выполнении стационарного обследования и лечения катаракты у пациентов пожилого возраста из Курской, Воронежской, Белгородской и Тамбовской областей. Диагноз катаракты устанавливался по результатам комплексного офтальмологического обследования с применением оптической когерентной томографии на аппарате DRI OCT Triton (Topson, Япония), компьютерной статической периметрии, микропериметрии на аппарате MAIA (CenterVue, Италия) и с учетом критериев, установленных «Федеральными клиническими рекомендациями по оказанию офтальмологической помощи пациентам с возрастной катарак-

той. Экспертный совет по проблеме хирургического лечения катаракты».

Среди включенных в исследование пациентов 60–74 лет с катарактой сформировано три группы: пациенты с катарактой ($n = 58$), пациенты с катарактой и СПА ($n = 49$), пациенты с катарактой и ССА ($n = 56$). Диагноз ССА и СПА осуществлялся в соответствии с показателями фенотипической модели ССА, предложенной Fried L. и соавт. [12]: потеря массы тела, снижение силы кисти при динамометрии, выраженная слабость и повышенная утомляемость, замедление скорости передвижения, значительное снижение физической активности. При наличии у пациентов с катарактой трех и более показателей устанавливался ССА, а при наличии одного или двух показателей — СПА.

У всех пациентов вышеназванных групп проведено изучение системных интерлейкинов иммуноферментным анализом с использованием соответствующих наборов «Протеиновый контур» (Санкт-Петербург). Для этого у обследованных больных в утренние часы производился забор венозной крови натощак, в сыворотке которой определялось содержание следующих интерлейкинов: IL-1, IL-1 β , IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-17 и IL-18. Полученные результаты заносились в специальные таблицы.

Данное исследование проводилось в соответствии с рекомендациями Хельсинкской декларации и после получения письменного согласия пациентов всех клинических групп.

Статистический анализ данных включал определение величин относительного риска по общепринятой формуле с расчетом доверительных интервалов [2], достоверности различий по критерию Краскела–Уоллиса.

Результаты

Изучение системного интерлейкинового профиля у пациентов пожилого возраста с катарактой и СПА по сравнению с пациентами такого же возрастного ценза с катарактой и с отсутствием СПА и ССА выявило статистически значимые изменения в содержании IL-1, IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-8, IL-10 и IL-13 (табл. 1). Так, содержание в сыворотке крови IL-1 повысилось среди больных с катарактой и СПА практически в 2 раза ($p < 0,001$). Уровень IL-1 β на системном уровне у пациентов 60–74 лет с катарактой, сочетанной с СПА, также достоверно увеличился по отношению к пациентам 60–74 лет с катарактой без СПА ($p < 0,001$). Статистически значимое повышение в содержании в крови у больных с катарактой и СПА выявлено и для IL-13. Однако максимальное увеличилось среди провоспалительных интер-

лейкинов в группе больных с катарактой и СПА содержание IL-8. Различие в сравнении с группой аналогичного возраста, имеющих только офтальмологическую патологию (катаракту) превысило 3 раза ($p < 0,001$).

Содержание интерлейкинов крови с провоспалительной активностью среди пациентов пожилого возраста с наличием катаракты и СПА характеризуется достоверным различием в сравнении с больными 60-74 лет, страдающими только катарактой. Однако в отличие от рассмотренного ранее широкого спектра провоспалительных интерлейкинов, содержание IL-4 и IL-10 на системном уровне при присоединении СПА у пациентов 60-74 лет с катарактой сопровождалось существенным угнетением их продукции по отношению к контрольной группе. При этом более существенно уменьшалось содержание в крови IL-10 – в 2,3 раза ($p < 0,001$). Статистически значимо, но в меньшей степени, чем уровень IL-10, снизилась продукция IL-4 ($p < 0,001$). Другие проанализированные интерлейкины в сыворотке крови пациентов с катарактой и СПА остались без существенных изменений – IL-5, IL-7, IL-9, IL-12, IL-17 и IL-18.

Таким образом, у пожилых пациентов с катарактой ухудшение гериатрического статуса с формированием СПА характеризуются достоверным повышением значительного количества интерлейкинов крови и угнетением выработки провоспалительных IL-4 и IL-10, несмотря на то, что уровень IL-7, IL-9, IL-12 и IL-18 остался практически на одном уровне с пациентами с катарактой без СПА.

Более выраженные нарушения интерлейкинового профиля у пациентов 60-74 лет с катарактой диагностированы в случае формирования ССА, представляющего куммулятивное накопление многих дефицитарных состояний, отражающих усугубление процессов негативного старения (табл. 2). Пациенты с катарактой и ССА характеризуются достоверным ухудшением системного интерлейкинового статуса, обусловленного прежде всего дальнейшим повышением активности провоспалительных интерлейкинов – IL-1, IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12, IL-13, IL-17. Иначе говоря, присоединение ССА у пожилых больных с катарактой сопровождается увеличением в сыворотке крови 6 интерлейкинов по сравнению с больными с катарактой и с СПА 4 из 11 провоспалительных интерлейкинов. При присоедине-

ТАБЛИЦА 1. СОДЕРЖАНИЕ ИНТЕРЛЕЙКИНОВ КРОВИ У ПОЖИЛЫХ ПАЦИЕНТОВ С КАТАРАКТОЙ И ССА, КАТАРАКТОЙ И СПА, КАТАРАКТОЙ, $M \pm m$ (пг/мл)

TABLE 1. CONTENT OF BLOOD INTERLEUKINS IN ELDERLY PATIENTS WITH CATARACT AND SSA, CATARACT AND SPA, CATARACT, $M \pm m$ (pg/ml)

Интерлейкины крови Blood interleukins	Пациенты с катарактой и ССА Patients with cataracts and SSA	Пациенты с катарактой и СПА Patients with cataracts and SPA	Пациенты с катарактой Patients with cataracts
IL-1	34,5 $\pm$ 1,9 ^{*,#}	27,1 $\pm$ 1,6 [*]	14,3 $\pm$ 1,2
IL-1 β	89,7 $\pm$ 2,0 ^{*,#}	72,1 $\pm$ 1,4 [*]	43,6 $\pm$ 1,7
IL-4	1,7 $\pm$ 0,4 ^{*,#}	2,9 $\pm$ 0,3 [*]	5,2 $\pm$ 0,6
IL-5	4,4 $\pm$ 0,6	3,4 $\pm$ 0,5	3,2 $\pm$ 0,3
IL-6	14,1 $\pm$ 1,4 ^{*,#}	9,8 $\pm$ 0,7 [*]	6,5 $\pm$ 0,8
IL-7	6,7 $\pm$ 0,9	5,2 $\pm$ 0,7	4,8 $\pm$ 0,6
IL-8	42,9 $\pm$ 2,6 ^{*,#}	19,5 $\pm$ 2,2 [*]	6,4 $\pm$ 1,3
IL-9	10,3 $\pm$ 1,2 [#]	8,2 $\pm$ 0,9	7,5 $\pm$ 1,2
IL-10	4,5 $\pm$ 0,6 ^{*,#}	8,1 $\pm$ 1,1 [*]	18,6 $\pm$ 1,5
IL-12	9,4 $\pm$ 0,9 [#]	8,3 $\pm$ 0,7	6,4 $\pm$ 0,9
IL-13	3,1 $\pm$ 0,5 ^{*,#}	1,3 $\pm$ 0,4 [*]	0,6 $\pm$ 0,2
IL-17	2,4 $\pm$ 1,6 ^{*,#}	10,4 $\pm$ 1,2	9,2 $\pm$ 1,0
IL-18	72,5 $\pm$ 2,9 [#]	66,4 $\pm$ 2,1	63,1 $\pm$ 2,4

Примечание. * – статистически значимое различие между пациентами 60-74 лет с катарактой, сочетанной с СПА, и с катарактой; ** – статистически значимое различие между пациентами с катарактой СПА и катарактой с ССА; # – статистически значимое различие между пациентами с катарактой и катарактой с ССА.

Note. *, statistically significant difference between patients aged 60-74 years with cataract combined with SPA and with cataract; **, statistically significant difference between patients with SPA cataract and cataract with SSA; #, statistically significant difference between patients with cataract and cataract with SSA.

ТАБЛИЦА 2. ОТНОСИТЕЛЬНЫЙ РИСК ДЛЯ ИНТЕРЛЕЙКИНОВ КРОВИ У ПАЦИЕНТОВ 60-74 ЛЕТ С КАТАРАКТОЙ И ССА, КАТАРАКТОЙ И ССП

TABLE 2. RELATIVE RISK FOR BLOOD INTERLEUKINS IN 60-74 YEAR OLD PATIENTS WITH CATARACT AND SSA, CATARACT AND SSP

Интерлейкин крови Blood interleukin	ССА и катаракта Frailty and cataract			СПА и катаракта Prefrailty and cataract		
	ОШ OR	ДИ DI	р	ОШ OR	ДИ DI	р
IL-1	1,45	1,27-1,76	0,001	1,27	1,04-1,49	0,002
IL-1 β	1,31	1,08-1,68	0,002	1,20	1,02-1,55	0,003
IL-4	1,38	1,15-1,72	0,003	1,21	1,09-1,47	0,001
IL-5	0,86	0,61-1,09	0,072	0,74	0,52-1,08	0,029
IL-6	1,57	1,32-1,83	0,005	1,19	1,04-1,42	0,005
IL-7	0,98	0,76-1,22	0,063	0,64	0,47-0,91	0,088
IL-8	2,86	2,57-3,19	0,001	1,93	1,72-2,29	0,001
IL-9	0,92	0,78-1,23	0,079	0,87	0,64-1,06	0,073
IL-10	2,39	2,14-2,67	0,002	2,15	2,01-2,43	0,004
IL-12	0,98	0,82-1,29	0,071	0,71	0,59-0,94	0,067
IL-13	1,39	1,15-1,56	0,012	1,23	1,08-1,57	0,006
IL-17	1,27	1,04-1,61	0,014	0,96	0,78-1,27	0,058
IL-18	1,09	0,85-1,30	0,068	0,74	0,56-0,92	0,049

нии ССА у пациентов с катарактой отмечается более существенное снижение противовоспалительных IL-4 и IL-10, чем на предыдущей стадии.

Выраженность иммунологических нарушений у пациентов с катарактой и ССА подтверждается наличием достоверных различий в содержании практически всех рассматриваемых интерлейкинов по сравнению с пациентами с изолированной катарактой, за исключением только IL-5 и IL-7, что свидетельствует о негативном влиянии ССА на системный интерлейкиновый статус пациентов с катарактой пожилого возраста.

Среди изученного широкого спектра системных интерлейкинов, согласно расчетным величинам относительного риска, способствуют формированию СПА у пожилых пациентов с катарактой значительное количество провоспалительных интерлейкинов, а также два рассматриваемых противовоспалительных интерлейкина.

Статистически значимо ухудшают гериатрический статус за счет формирования СПА у больных с катарактой такие провоспалительные интерлейкины, как IL-1, IL-1 β , IL-6, IL-8 и IL-13, при повышении продукции которых риск развития данного дефицитарного состояния (СПА) возрастает в 1,19 раза за счет IL-6 до 1,93 раза за счет IL-8. Статистически значимый и высокий риск формирования СПА у пожилых пациентов, страдающих катарактой обусловлен также увеличением содержания в крови IL-1, IL-1 β , IL-13, причем вероятность ухудшения гериатрического

профиля за счет вышеуказанных интерлейкинов практически одинакова с доверительными интервалами в обоих случаях. Важным, на наш взгляд, является и то, что в формировании СПА у пациентов 60-74 лет с катарактой высоким относительным риском участвуют и системные противовоспалительные интерлейкины IL-4, IL-10 и особенно повышает (в 2,15 раза) вероятность развития СПА угнетение продукции IL-10.

Участие рассмотренных выше системных интерлейкинов сохраняется и при усугублении гериатрического статуса пожилых пациентов с катарактой с переходом СПА в ССА. Как и в случае СПА, при ССА высокий риск формирования последнего ассоциирован среди провоспалительных интерлейкинов с IL-1, IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-13, но величина их вклада существенно увеличилась. Так, особенно повысился относительный риск развития ССА у пациентов 60-74 лет с катарактой вследствие увеличения экспрессии IL-6 до 1,57 раза по сравнению с СПА, когда величина относительного риска составляла 1,19 с достоверным доверительным интервалом в обоих случаях. Увеличился также риск развития ССА за счет повышения IL-1 на системном уровне. Среди провоспалительных интерлейкинов при ССА достоверным оказался относительный риск IL-17, тогда как при СПА его влияние не являлось статистически значимым. Наблюдается при ССА у больных с катарактой тенденция к повышению влияния и для IL-18, но доверительный интервал оказался недостоверным.

В наибольшей же степени формирование ССА у пациентов 60–74 лет, страдающих катарактой, как среди провоспалительных, так и противовоспалительных системных интерлейкинов ассоциировано с IL-8, с которым риск развития ССА при катаракте повышается в 2,86 раза ($p = 0,001$). Далее в порядке убывания влияния системных интерлейкинов на формирование ССА в пожилом возрасте у пациентов с катарактой следуют IL-6, IL-10, IL-1 и IL-13. Поэтому, проанализировав большой спектр системных интерлейкинов, можно утверждать об ассоциации у пациентов 60–74 лет с катарактой с IL-8, IL-6, IL-10, IL-1 и IL-13. Примечательно, что данные системные интерлейкины ассоциированы и с ранней стадией ССА у больных с катарактой — СПА.

Обсуждение

ССА в настоящее время рассматривается как гериатрическое состояние, возникающее в результате патофизиологических изменений в мышечной, нейроэндокринной и иммунной системах и имеет различные проявления от развития двигательных нарушений до выраженного зрительного дефицита [19, 23]. Именно иммунологические нарушения и сопутствующее этому слабое хроническое воспаление (inflammation) считаются основными патофизиологическими факторами и механизмами, ответственными за развитие и прогрессирование офтальмологических заболеваний и ССА [1, 16, 22]. Однако изучение профиля интерлейкинового риска у пациентов с катарактой, ведущей причиной зрительного дефицита и других дефицитарных проявлений ССА, среди пожилых, страдающих катарактой в сочетании с СПА и ССА, насколько нам известно из опубликованных статей, до настоящего времени не анализировалось. Нарушения интерлейкинового профиля рассматриваются, как правило, отдельно — при офтальмологической патологии и ССА, что не позволяет выявить общность системного интерлейкинового дисбаланса в развитии изолированного ССА без нарушения зрения и при сочетании болезней глаза с ССА и СПА.

В отдельных исследованиях показано, что ССА выявляется у 91,0% пациентов старческого возраста с открытоугольной глаукомой, что существенно выше, чем у людей аналогичного возрастного ценза, не имеющих открытоугольной глаукомы — всего в 53,0% случаев [6]. Несмотря на одинаковый возраст пациентов сравниваемых групп — $72,3 \pm 1,4$ лет с глаукомой и $72,2 \pm 1,0$ лет без глаукомы ССА диагностирован чаще среди первых, нежели у вторых, что свидетельствует о неблагоприятном старении больных с глаукомой. Однако изменения интерлейкинов на системном уровне у пациентов с глаукомой равно, как и с другими офтальмологическими заболеваниями,

и ССА в рассматриваемом исследовании [6] не представлены.

Известно об изменении провоспалительных цитокинов — IL-1 β и TNF α в сыворотке крови у пациентов 61–83 лет с катарактой до выполнения хирургического лечения патологии [7]. Авторами установлено статистически значимое повышение TNF α у пациентов с катарактой до $1,070 \pm 0,141$ пг/мл по сравнению с $0,093 \pm 0,044$ пг/мл в группе без катаракты ($p < 0,001$), но изменение IL-1 β с $0,080 \pm 0,038$ пг/мл в контроле до $0,350 \pm 0,075$ пг/мл в группе с катарактой оказалось недостоверным ($p = 0,069$).

В другом исследовании [8] содержание в крови TNF α у более молодых больных с катарактой — от 28 до 55 лет — до проведения хирургического вмешательства составило 0,80 пг/мл. Содержание же изученных системных интерлейкинов — IL-1 β , IL-4 и IL-6 составило в среднем 6,90 пг/мл, 2,50 пг/мл и 0,70 пг/мл соответственно, что существенно ниже, чем у обследованных нами пациентов пожилого возраста с изолированной катарактой и катарактой, сочетанной с СПА и ССА. В этом контексте менее выраженные сдвиги в уровне интерлейкинов среди пациентов молодого возраста объясняется тем, что при ССА более высокие уровни сывороточных иммунных медиаторов наблюдаются у пожилых людей по сравнению с молодыми и связаны с патофизиологией ССА [19, 25].

В исследованиях, изучавших взаимосвязь между параметрами воспаления и ССА, чаще рассматривались IL-6 и TNF α [22]. Так, содержание только IL-6 в сыворотке крови пациентов с ССА оказалось достоверно выше (6,4 пг/мл), чем у людей такого же возраста с отсутствием ССА — 4,7 пг/мл [14]. Среди обследованных нами пациентов с СПА и катарактой, ССА и катарактой диагностированы более высокие значения IL-6 на системном уровне. Повышенное содержание циркулирующих иммунологических медиаторов, таких как IL-6, часто используется в качестве суррогатных точек для inflammation и ассоциируется с ССА [11]. Увеличение в сыворотке крови IL-6 считается важным фактором, способствующим возникновению ССА, в который также вовлечен и TNF α [18, 24], но медиана уровня TNF α у пациентов старше 80 лет с ССА в сыворотке крови составила 1,7 пг/мл с межквартильным диапазоном 1,0–2,6 пг/мл и достоверно не различалась от медианы людей такого же возраста без ССА — 1,7 пг/мл с межквартильным интервалом 1,1–2,4 пг/мл [14].

Есть доказательства того, что противовоспалительные IL-4 и IL-10, хотя и вовлечены в меньшей степени, также ассоциируются с ССА [13, 15]. Наши результаты на основе рассчитанных величин относительного риска для IL-4 и IL-10,

составивших у пациентов с СПА и катарактой 1,21 и 2,15 соответственно и с ССА и катарактой 1,38 и 2,39 соответственно, свидетельствует о существенном повышении риска развития СПА и ССА у пожилых больных с катарактой при снижении IL-4 и IL-10 на системном уровне. Обнаружена также слабая связь между IL-10 и ССА при нескорректированном анализе, который был связан и с хронологическим возрастом, и с ССА [21]. Несмотря на это, необходимы дальнейшие исследования по изучению связей интерлейкинов крови не только у пациентов с ССА, но и у больных с сочетанным ССА и катарактой.

Заключение

Развитие СПА и ССА у пожилых пациентов с катарактой сопровождается существенными из-

менениями системного интерлейкинового статуса с гиперпродукцией провоспалительных интерлейкинов IL-1, IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-13, IL-17 и угнетением активности противовоспалительных IL-4, IL-10. При прогрессировании СПА в ССА у больных с катарактой участвуют помимо вышеперечисленных интерлейкинов дополнительно IL-9, IL-12 и IL-18, сдвиги в системе интерлейкинов крови статистически значимо усугубляются, а величины относительного риска повышаются. Формированию ССА при катаракте в значительной степени, согласно величинам относительного риска, способствуют IL-8, IL-6, IL-10, IL-1 и IL-13. Поэтому улучшение системного интерлейкинового профиля может способствовать замедлению развития ССА у больных с катарактой.

Список литературы / References

1. Агарков Н.М., Гурко Т.С., Лев И.В. Изменение системы комплемента крови в развитии диабетической ретинопатии в пожилом возрасте // Научные результаты биомедицинских исследований, 2021. Т. 7, № 2. С. 173-180. [Agarkov N.M., Gurko T.S., Lev I.V. Changes in the blood complement system in the development of diabetic retinopathy in old age. *Nauchnye rezultaty biomeditsinskikh issledovaniy = Scientific Results of Biomedical Research*, 2021, Vol. 7, no. 2, pp. 173-180. (In Russ.)].
2. Айвазян С.А., Мхитарян В.С. Прикладная статистика и основы эконометрии. М.: ЮНИТИ, 2001. 656 с. [Ayvazyan S.A., Mkhitarayan V.S. *Applied statistics and fundamentals of econometrics*. Moscow: UNITY, 2001. 656 p.
3. Балацкая Н.В., Ермеева Е.А., Слепова О.С. Субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови у пациентов с возрастной макулярной дегенерацией // Медицинская иммунология, 2015. Т. 17, № 5. С. 461-466. [Balatskaya N.V., Ermeeva E.A., Slepova O.S. Subpopulation composition of peripheral blood lymphocytes in patients with age-related macular degeneration. *Meditinskaya immunologiya = Medical immunology (Russia)*, 2015, Vol. 17, no. 5, pp. 461-466. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2015-5-461-466.
4. Девяткин А.А., Егорова Е.В. Системные механизмы иммунитета у больных старческой катарактой при проведении иммунокорректирующей терапии // Вестник Оренбургского государственного университета, 2004. № 5, С. 147-149. [Devyatkin A.A., Egorova E.V. Systemic mechanisms of immunity in patients with senile cataract during immunocorrective therapy. *Vestnik Orenburgskogo gosudarstvennogo universiteta = Bulletin of the Orenburg State University*, 2004, no. 5, pp. 147-149. (In Russ.)].
5. Коняев Д.А., Попова Е.В., Титов А.А., Агарков Н.М., Яблоков М.М., Аксенов В.В. Распространенность заболевания глаз у пожилых – глобальная проблема современности // Здравоохранение Российской Федерации, 2021. Т. 65, № 1. С. 62-68. [Konayev D.A., Popova E.V., Titov A.A., Agarkov N.M., Yablokov M.M., Aksekov V.V. The prevalence of eye disease in the elderly is a global problem of our time. *Zdravoohranenie Rossiyskoy Federatsii = Healthcare of the Russian Federation*, 2021, Vol. 65, no. 1, pp. 62-68. (In Russ.)].
6. Малишевская Т.Н., Долгова И.Г., Шатских С.В. Персонализированный подход к ведению пациентов с глаукомой продвинутых стадий. Выбор стратегических направлений антиглаукомной работы в Тюменской области // Национальный журнал глаукома, 2016. Т. 15, № 4. С. 42-53. [Malishevskaya T.N., Dolgova I.G., Shatskikh S.V. Personalized approach to the management of patients with advanced glaucoma. The choice of strategic directions of anti-glaucoma work in the Tyumen region. *Natsionalnyy zhurnal glaucoma = National Journal of Glaucoma*, 2016, Vol. 15, no. 4, pp. 42-53. (In Russ.)].
7. Намазова И.К., Саилова Г.Т., Меджидова С.Р., Салманова А.Р. Определение цитокинов в сыворотке крови и во влаге передней камеры при псевдоэкзофалиативном синдроме и катаракте // Успехи геронтологии, 2020. Т. 33, № 2. С. 352-359. [Namazova I.K., Smailova G.T., Medzhidova S.R., Salmanova A.R. Determination of cytokines in blood serum and in anterior chamber moisture in pseudoexfoliative syndrome and cataract. *Uspekhi gerontologii = Advances in Gerontology*, 2020, Vol. 33, no. 2, pp. 352-359. (In Russ.)].
8. Созуракова Е.А., Громакина Е.В., Шабалдин А.В., Штернис Т.А., Седова Д.Ю., Третьяк Е.А., Шигарева С.О. Оценка роли иммунорегуляторного потенциала в ограничении локального воспаления в передней камере глаза (на примере пресениальной катаракты) // Современные проблемы науки и образования, 2019. № 2. С. 129. [Sozurakova E.A., Gromakina E.V., Shabaldin A.V., Shternis T.A., Sedova D.Yu., Tretyak E.A., Shigareva S.O. Assessment of the role of immunoregulatory potential in limiting local inflammation in the anterior chamber of the eye (on the example of presenial cataract). *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya = Modern Problems of Science and Education*, 2019, no. 2, p. 129. (In Russ.)].
9. Чукаева И.И., Ларина В.Н. Возраст-ассоциированные состояния (гериатрические синдромы) в практике врача-терапевта поликлиники // Лечебное дело, 2017. № 1. С. 6-15. [Chukaeva I.I., Larina V.N. Age-

associated conditions (geriatric syndromes) in the practice of a polyclinic therapist. *Lechebnoe delo = Medicine*, 2017, no. 1, pp. 6-15. (In Russ.)]

10. Чухраев А.М., Агарков Н.М., Прощаев К.И., Ильницкий А.Н. Особенности локального интерлейкинового статуса пожилых больных первичной закрытоугольной глаукомой // Офтальмология, 2021. Т. 18, № 1. С. 123-128. [Chukhraev A.M., Agarkov N.M., Proshaev K.I., Ilnitsky A.N. Features of the local interleukin status of elderly patients with primary angle-closure glaucoma. *Oftalmologiya = Ophthalmology*, 2021, Vol. 18, no. 1, pp. 123-128. (In Russ.)]

11. Chen X., Shi S., Zhu L., Gu N. IL-6 and TNF- α induced obesity-related inflammatory response through transcriptional regulation of miR-146b. *J. Interferon Cytokine Res.*, 2014, Vol. 34, no. 5, pp. 342-348.

12. Fried L.P., Carlson M.C., Freedman M., Frik K.D., Glass T.A., Hill J., McGill S., Rebok G.W., Seerman T., Tielsch J., Wasik B.A., Zeger S. A social model for health promotion for an aging population: initial evidence on the Experience Corps model. *J. Urban Health*, 2004, Vol. 841, no. 1, pp. 64-78.

13. Juarez-Cedillo T., Vargas-Alarcon G., Martinez-Rodriguez N., Juarez-Cedillo E., Fragoso J.M., Escobedo-de-la-Pena J. Interleukin 10 gene polymorphisms and frailty syndrome in elderly Mexican people: (Sadem study). *Mol. Genet. Genom. Med.*, 2019, Vol. 7, no. 9, e918. doi: 10.1002/mgg3.918.

14. Junior G.S., Perez D.I., Tonet-Furioso A.C., Gomes L., Vilaca K.H., Alves V.P., Moraes C.F., Nobrega O.T. Circulating Interleukin-6 (but not other immune mediators) associates with criteria for Fried's frailty among very old adults. *J. Aging Res.*, 2020, Vol. 2020, 6831791. doi: 10.1155/2020/6831791.

15. Junior G.S., Souza V.C., Machado-Silva W., Henriques A.D., Avelar G.G., Perez D.I., Lima R.M., Silva R.J., Brito C.J., Nobrega O.T. Resistance training modulates the humoral inflammatory (but not the DNA methylation) profile of diabetic older adults using metformin. *Neuroimmunomodulation*, 2019, Vol. 26, pp. 1-8.

16. Liu C.K., Lyass A., Larson M.G., Massaro J.M., Wang N., D'Agostino R.B., Benjamin E.J., Murabito J.M. Biomarkers of oxidative stress are associated with frailty: the Framingham Offspring Study. *Age (Dordr.)*, 2016, Vol. 38, no. 1, 1. doi: 10.1007/s11357-015-9864-z.

17. Morley J.E., Vellas B., Kan G.A., Anker S.D., Bauer J.M., Bernabei R., Cesari M., Chumlea W.C., Doehner W., Evans J., Fried L.P., Guralnik J.M., Katz P.R., Malmstrom T.K., McCarter R.J., Robledo L.M., Rockwood K., Haehling S., Vandewoude M.F., Walston J. Frailty consensus: a call to action. *J. Am. Med. Dir. Assoc.*, 2013, Vol. 14, no. 6, pp. 392-397.

18. Nascimento C.M., Zazzetta M.S., Gomes G.A., Orlandi F.S., Gramani-Say K., Vasilceac F.A., Gratao A.C., Pavarini S.C., Cominetti M.R. Higher levels of tumor necrosis factor beta are associated with frailty in socially vulnerable community-dwelling older adults. *BMC Geriatr.*, 2018, Vol. 18, no. 1, 268. doi: 10.1186/s12877-018-0961-6.

19. Pawelec G., Bronikowski A., Cunnane S.C., Ferrucci L., Franceschi C., Fulop T., Gaudreau P., Gladyshev V.N., Gonos E.S., Gorbunova V., Kennedy B.K., Larbi A., Lemaitre J., Liu G., Maier A.B., Morais J.A., Nobrega O.T., Moskalev A., Rikert M.O., Seluanov A., Senior A.M., Ukraintseva S., Vanhaelen Q., Witkowski J., Cohen A.A. The conundrum of human immune system "senescence". *Mech. Ageing Dev.*, 2020, Vol. 192, 111357. doi: 10.1016/j.mad.2020.111357.

20. Pivetta N.R., Marincolo J.C., Neri A.L., Aprahamian I., Yassuda M.S., Borim F.S. Multimorbidity, frailty and functional disability in octogenarians: a structural equation analysis of relationship. *Arch. Gerontol. Geriatr.*, 2019, Vol. 86, 103931. doi: 10.1016/j.archger.2019.103931

21. Ou T., Yang H., Walston J.D., Fedarko N.S., Leng S.X. Upregulated monocytic expression of CXCL10 chemokine ligand 10 (CXCL-10) and its relationship with serum interleukin-6 levels in the syndrome of frailty. *Cytokine*, 2009, Vol. 46, pp. 319-324.

22. Soysal P., Stubbs B., Lucato P., Luchini C., Solmi M., Peluso R., Sergi G., Isik A.T., Manzato E., Maggi S., Maggio M., Prina A.M., Cosco T.D., Wu Y., Veronese N. Inflammation and frailty in the elderly: A systematic review and meta-analysis. *Ageing Res. Rev.*, 2016, Vol. 31, pp. 1-8.

23. Vetrano D.L., Palmer K.M., Galluzzo L., Giampaoli S., Marengoli A., Bernabei R., Onder G. Hypertension and frailty: a systematic review and meta-analysis. *BMJ Open*, 2018, Vol. 8, Iss. 12, e024406. doi: 10.1136/bmjopen-2018-024406.

24. Yarla N.S., Polito A., Peluso I. Effects of olive oil on TNF-alpha and IL-6 in humans: implication in obesity and frailty. *Endocr. Metab. Immune Disord. Drug Targets*, 2018, Vol. 18, no. 1, pp. 63-74.

25. Zuo Z., Li J., Ge S., Shen M., Wang Y., Zhou C., Wu R., Hu J. Bryostatin-1 ameliorated experimental colitis in IL-10^{-/-} Mice by protecting the intestinal barrier and limiting immune dysfunction. *J. Cell. Mol. Med.*, 2019, Vol. 23, no. 8, pp. 5588-5599.

Авторы:

Фабрикантов О.Л. — д.м.н., профессор, директор Тамбовского филиала ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» имени академика С.Н. Федорова» Министерства здравоохранения РФ, г. Тамбов, Россия

Османов Р.Э. — к.м.н., врач-офтальмолог Тамбовского филиала ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» имени академика С.Н. Федорова» Министерства здравоохранения РФ, г. Тамбов, Россия

Authors:

Fabrikantov O.L., PhD, MD (Medicine), Professor, Director, S. Fyodorov Eye Microsurgery Federal State Institution, Tambov Branch, Tambov, Russian Federation

Osmanov R.E., PhD (Medicine), Clinical Ophthalmologist, S. Fyodorov Eye Microsurgery Federal State Institution, Tambov Branch, Tambov, Russian Federation

Поступила 28.12.2021

Принята к печати 15.01.2022

Received 28.12.2021

Accepted 15.01.2022

ОЦЕНКА ИНФОРМАТИВНОСТИ ИССЛЕДОВАНИЯ УРОВНЯ СПЕЦИФИЧЕСКИХ IgE К АЛЛЕРГЕНУ ЦЕЛЬНОГО КОРОВЬЕГО МОЛОКА И ЕГО КОМПОНЕНТАМ, А ТАКЖЕ К СОЕ И КЛЕЙКОВИНЕ У ДЕТЕЙ

Ковязина Н.А.¹, Алхутова Н.А.¹, Камаев А.В.², Трусова О.В.²,
Жижина О.Л.³, Егорова М.О.⁴

¹ ФГБУ «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А.М. Никифорова» МЧС России, Санкт-Петербург, Россия

² ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

³ ЧОУВО «Санкт-Петербургский медико-социальный институт», Санкт-Петербург, Россия

⁴ «ОМБ», Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Успех формирования толерантности к белкам коровьего молока во многом зависит от своевременности и обоснованности элиминационной диеты и наиболее затруднен при IgE-опосредованной форме пищевой аллергии. С 2012 по 2017 гг. при обследовании детей в возрасте от 3 месяцев до 10 лет нами были выявлены случаи, когда уровень специфических иммуноглобулинов Е к бета-лактоглобулину превышал концентрацию специфических IgE к аллергену цельного коровьего молока, который зачастую используется в качестве скринингового аллергена. Целью настоящего исследования было оценить информативность исследования уровня специфических IgE к комплексу аллергенов цельного коровьего молока в сыворотке крови детей раннего, дошкольного и младшего школьного возраста. Мы также включили в перечень исследуемых аллергенов клейковину (глютен) и сою в качестве возможных компонентов раннего детского питания.

В исследование включены 100 детей в возрасте от 9 месяцев до 12 лет. Клиническим критерием отбора было наличие анамнестических указаний на обострение атопического дерматита, крапивницы, обострение ринита/астмы, диарею, запор или боли в животе в ответ на употребление коровьего молока и/или молочных продуктов в течение последних 6 месяцев. Показано, что комплексное исследование уровней специфических IgE к аллергену цельного коровьего молока, его компонентам, а также к сое и клейковине повышает точность лабораторной диагностики и дифференциальной диагностики IgE-опосредованной формы пищевой аллергии к белкам коровьего молока по сравнению с определением концентрации sIgE к цельному коровьему молоку в качестве скринингового теста. Развернутое исследование уровней специфических IgE к компонентам молока позволило подтвердить наличие IgE-опосредованной формы аллергии к коровьему молоку у 7% обследованных детей с симптомами пищевой аллергии, но с отсутствием специфических IgE к аллергену цельного коровьего

Адрес для переписки:

Ковязина Надежда Алексеевна
ФГБУ «Всероссийский центр экстренной и радиационной
медицины имени А.М. Никифорова»
194044, Россия, Санкт-Петербург,
ул. Акад. Лебедева, 4/2.
Тел.: 8 (812) 702-63-45.
E-mail: nakovzn@gmail.com

Address for correspondence:

Kovyazina Nadezhda A.
A. Nikiforov Russian Center of Emergency and Radiation
Medicine
194044, Russian Federation, St. Petersburg,
Acad. Lebedev str., 4/2.
Phone: 7 (812) 702-63-45.
E-mail: nakovzn@gmail.com

Образец цитирования:

Н.А. Ковязина, Н.А. Алхутова, А.В. Камаев,
О.В. Трусова, О.Л. Жижина, М.О. Егорова «Оценка
информативности исследования уровня специфических
IgE к аллергену цельного коровьего молока и его
компонентам, а также к сое и клейковине, у детей» // *Медицинская иммунология*, 2022. Т. 24, № 2. С. 317-326.
doi: 10.15789/1563-0625-SIO-1774
© Ковязина Н.А. и соавт., 2022

For citation:

N.A. Kovyazina, N.A. Alkhutova, A.V. Kamaev, O.V. Trusova,
O.L. Zhizhina, M.O. Egorova "Studying informativity
of specific IgE levels to whole cow milk allergen and its
components, as well as to soy and gluten in children", *Medical
Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2022,
Vol. 24, no. 2, pp. 317-326.
doi: 10.15789/1563-0625-SIO-1774
DOI: 10.15789/1563-0625-SIO-1774

молока, а также выявить 29% случаев, когда уровень специфических IgE к компонентам молока был выше, чем к аллергену цельного коровьего молока. Результаты исследования могут иметь практическое значение, поскольку клинико-иммунологическая форма пищевой аллергии, а также интенсивность и динамика снижения продукции специфических IgE являются принятыми критериями прогноза формирования толерантности к белкам коровьего молока. Кроме того, выявление аллергена (в том числе аллергена сои), вызывающего максимально интенсивную продукцию специфических IgE, может оказаться важным для формирования обоснованной элиминационной диеты.

Наиболее значимыми аллергенами для диагностики и дифференциальной диагностики аллергии к коровьему молоку у детей помимо аллергена «цельное коровье молоко, f2» представляются следующие аллергены: «молочная сыворотка, f236», «бета-лактоглобулин, f77» и «соя, f14».

Ключевые слова: пищевая аллергия, компоненты молока, специфические IgE

STUDYING INFORMATIVITY OF SPECIFIC IgE LEVELS TO WHOLE COW MILK ALLERGEN AND ITS COMPONENTS, AS WELL AS TO SOY AND GLUTEN IN CHILDREN

Kovyazina N.A.^a, Alkhutova N.A.^a, Kamaev A.V.^b, Trusova O.V.^b, Zhizhina O.L.^c, Egorova M.O.^d

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

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

^c St. Petersburg Medical and Social Institute, St. Petersburg, Russian Federation

^d OMB Company, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. Successive development of immunological tolerance to cow's milk proteins largely depends on the timeliness and validity of the elimination diet and is most difficult in IgE-mediated food allergy. From 2012 to 2017, when examining children aged 3 months to 10 years, we found some cases with high levels of specific IgE to beta-lactoglobulin that exceeded the levels of specific IgE to the whole cow's milk allergen (the latter is often used as a screening allergen). The aim of this study was to assess the informativity of studying the levels of specific IgE to the whole cow's milk allergens in blood serum of children at early, preschool and primary school age. We have also included gluten (gluten) and soy as possible components of early childhood nutrition into the list of allergens under study.

The study involved 100 children aged 9 months to 12 years. Clinical selection criteria included presence of anamnestic data on exacerbation of atopic dermatitis, urticaria, exacerbation of rhinitis/asthma, diarrhea, constipation or abdominal pain in response to usage of cow's milk and/or dairy products during the last 6 months. It is shown that extended study of specific IgE levels to whole cow's milk allergen, its components, as well as to soy and gluten, increases the accuracy of laboratory diagnostics and differential diagnosis of IgE-mediated form of food allergy to cow's milk proteins, compared with determination of serum IgE to whole cow's milk as a screening test. A detailed study of specific IgE to milk components allowed to confirm the presence of IgE-mediated form of allergy to cow's milk in 7% of the examined children with signs of food allergy, but in absence of specific IgE to whole cow's milk allergen. We have also shown that in 29% of cases, the level of specific IgE to milk components was higher than those to whole cow's milk allergen. The results of this study may be of practical importance, since the form of food allergy, as well as intensity and dynamics of reduction of production of specific IgE, are accepted criteria to forecast development of tolerance to cow's milk proteins. In addition, identification of specific allergen (including soy bean allergen) that causes the most intense production of specific IgE, may be importance for administration of a reasonable elimination diet.

The most significant allergens for diagnosis and differential diagnostics of allergy to cow's milk in children, in addition to the "whole cow's milk, f2" preparation, are the following allergens: "whey, f236", "beta-lactoglobulin, f77" and "soy, f14".

Keywords: food allergy, milk components, specific IgE

Введение

Пищевая аллергия к коровьему молоку и его компонентам — часто встречаемое заболевание у детей раннего, дошкольного и младшего школьного возраста, которое может существенно повлиять на состояние здоровья ребенка при его взрослении [3, 7]. Так, сенсибилизация к белкам коровьего молока зачастую является провокатором «атопического марша» и бронхиальной астмы, может быть причиной задержки роста и других патологических состояний [9, 10]. Клинические симптомы аллергии к молоку могут носить как выраженный, так и стертый характер, а также могут быть непатогномоничны, что существенно затрудняет своевременную постановку диагноза [1, 6]. При этом лабораторные алгоритмы диагностики и контроля эффективности лечения аллергии к коровьему молоку в настоящее время дискуссионны, а клиническая информативность доступных лабораторных тестов в полной мере не изучена. В то же время известно, что успех формирования толерантности к белкам коровьего молока во многом зависит от своевременности и обоснованности элиминационной диеты и наиболее затруднен в случае IgE-опосредованной формы пищевой аллергии [5].

С 2012 по 2017 г. нами было проведено лабораторное обследование 187 детей в возрасте от 3 месяцев до 10 лет, которое показало, что иммунохемилуминесцентный метод исследования уровня специфических IgE (sIgE) к аллергену цельного коровьего молока и его компонентам на анализаторе «ИММУЛАЙТ 2000/XPi» информативен при разных подходах к прогнозированию и оценке эффективности лечения пищевой аллергии: как ориентированном на критическое диагностическое значение, так и учитывающем степень снижения уровня антител [4]. В ходе обследования также были выявлены случаи, когда уровень sIgE к бета-лактоглобулину был выше, чем к цельному коровьему молоку. Таким образом, была показана вероятность гиподиагностики IgE-опосредованной аллергии к коровьему молоку, если лабораторное обследование ограничивается определением уровня sIgE к цельному коровьему молоку как к скрининговому аллергену. Данный факт обусловил необходимость проведения развернутого исследования уровней sIgE к аллергену цельного коровьего молока (комплекс аллергенов) и его компонентам [8] в сыворотке крови детей раннего, дошкольного и младшего школьного возраста. Мы также включили в перечень исследуемых аллергенов клейковину (глютен) и сою в качестве возможных компонентов раннего детского питания [2].

Цель исследования — оценить информативность исследования уровней sIgE к белкам коровьего молока, а также к сое и клейковине, в

сыворотке крови детей раннего, дошкольного и младшего школьного возраста.

Материалы и методы

В период с августа по декабрь 2018 г. в исследование включены 100 детей в возрасте от 9 месяцев до 12 лет, среди которых было 55 мальчиков и 45 девочек. Клиническим критерием отбора было наличие анамнестических указаний на обострение атопического дерматита, крапивницу, обострение ринита/астмы, диарею, запор или боли в животе в ответ на употребление коровьего молока и/или молочных продуктов в течение последних 6 месяцев.

Преобладающим клиническим симптомом у обследованных детей был дерматит (84%); также имели место крапивница (12%), ринит (7%). У 8% детей были отмечены запоры и боли в животе, у 14% — диарея и метеоризм. 51% обследованных детей, со слов матери, реагировали на молоко в любом виде и количестве.

У всех обследованных детей в сыворотке крови определяли уровень sIgE к аллергену коровьего молока и его компонентам: α -лактальбумину, β -лактоглобулину, казеину, кипяченому молоку, молочной сыворотке, а также клейковине и соевому белку (глютену). Определение уровней sIgE проводили иммунохемилуминесцентным методом на анализаторе «ИММУЛАЙТ 2000», DPC, США с использованием системы реагентов: «3gAllergy™ Specific IgE Universal Kit», «набор реагентов для определения чувствительности к аллергену коровьего молока / milk (fresh cow's milk), f2», «набор реагентов для определения чувствительности к аллергену α -лактальбумина / alpha-lactalbumin (purified from bovine milk — type III, calcium depleted), f76», «набор реагентов для определения чувствительности к аллергену бета-лактоглобулина / beta-lactoglobulin (putified from bovine milk), f77», «набор реагентов для определения чувствительности к аллергену казеина / casein (hammarsten bovine), f78», «набор реагентов для определения чувствительности к аллергену кипяченого молока / boiled milk (pasteurized non-fat boiled cow's milk), f231», «набор реагентов для определения чувствительности к аллергену молочной сыворотке / whey (collected from bovine milk), f236», «набор реагентов для определения чувствительности к аллергену сои / soybean (glycine max), f14», «набор реагентов для определения чувствительности к аллергену клейковины / gluten (from wheat), f79». Внутривнутрилабораторный контроль качества исследований проводился с использованием двухуровневого контроля 3gAllergy™ Specific IgE Universal Kit Controls и негативного контрольного материала 3gAllergy™ Specific IgE Negative Control, изготовленного на основе сыворотки крови человека, отсутствие в которой большинства IgE под-

ТАБЛИЦА 1. ИНТЕРВАЛЫ ЗНАЧЕНИЙ КОНЦЕНТРАЦИИ sIgE И ИХ ИНТЕРПРЕТАЦИЯ

TABLE 1. RANGE OF VALUES OF CONCENTRATION OF sIgE AND THEIR INTERPRETATION

Концентрация sIgE, МЕ/мл SgE concentration, IU/ml	< 0,1	0,10-0,34	0,35-0,69	0,70-3,49	3,50-17,49	> 17,5
Интерпретация Interpretation	Отсутствует или неопределяемый Missing or undetectable	Очень низкий Very low	Низкий Low	Умеренный Moderate	Высокий High	Очень высокий Very high

тверждено методом хроматографии. Рабочий диапазон системы реагентов 3gAllergy™ Specific IgE Universal Kit — 0,1-100,0 МЕ/мл (WHO 2nd IRP 75/502). Максимальный коэффициент межсерийной вариации (прецизионности) составил 12%; оценка правильности не проводилась, поскольку данный тест не представлен в международной и Федеральной системах внешней оценки качества. Результаты исследования специфических антител оценивали по следующей стандартной классификации, указанной в инструкции к набору реагентов (табл. 1). Результаты исследования менее 0,15 МЕ/мл расценивали как неопределяемые с учетом функциональной чувствительности метода — 0,2 МЕ/мл, указанной в инструкции к системе реагентов.

Результаты

У 48 из 100 детей (48%) sIgE к аллергену цельного коровьего молока и его компонентам, а также сое и клейковине в сыворотке крови отсутствовали. В то же время жалобы на непереносимость коровьего молока в любом виде и количестве были зафиксированы у них в 58% случаев.

Также у 48 детей (48%) в сыворотке крови были выявлены sIgE к аллергену цельного коровьего молока и/или его компонентам, кроме того у 15 (15%) — к клейковине, а у 20 (20%) — к сое: всего 52 ребенка. Концентрация выявленных sIgE составляла от 0,15 до > 100 МЕ/мл (табл. 2). Жалобы на непереносимость коровьего молока в любом виде и количестве присутствовали у этих 52 детей (по данным истории болезни) в 44% случаев.

Из 19 детей в возрасте до 18 месяцев sIgE были выявлены у 8 детей. При этом дерматит был отмечен у всех 8 детей с выявленными sIgE, в 50% случаев имели место диарея и метеоризм, и у одного ребенка по анамнестическим данным присутствовали запоры и боли в животе. У остальных 11 из 19 обследованных детей в возрасте до 18 месяцев (в сыворотке крови которых указанные sIgE отсутствовали) дерматит был выявлен аллергологом в 80% случаев, а диарея и метеоризм

встречались только у одного ребенка, в то время как запоры и боли в животе — у четырех.

В соответствии с данными истории болезни эозинофилия зафиксирована у 6 из 8 детей в возрасте до 18 месяцев с выявленными sIgE (80%) в отличие от всего двух случаев (18%) эозинофилии среди детей с отсутствием sIgE в сыворотке крови. Таким образом, у детей в возрасте до 18 месяцев эозинофилия чаще имела место при наличии sIgE к аллергену цельного коровьего молока и его компонентам.

Из 22 детей в возрасте от 18 до 36 месяцев sIgE были выявлены у 11 детей. Преобладающим клиническим симптомом (80%) у детей этого возраста с выявленными sIgE был дерматит, а диарея и метеоризм или запоры и боли в животе отмечены только в двух случаях. У остальных 11 из 22 обследованных детей в возрасте от 18 месяцев до трех лет (в сыворотке крови которых указанные sIgE отсутствовали) дерматит был выявлен аллергологом в 73% случаев, диарея и метеоризм встречались только у двух детей, запоры и боли в животе — у одного ребенка.

Из 36 детей в возрасте от 18 до 36 месяцев sIgE были выявлены у 23 детей. Дерматит имел место у 19 детей (83%) с выявленными sIgE и был единственным клиническим симптомом аллергии у 13 из них. Среди других клинических проявлений аллергологом были отмечены ринит у четырех детей (17%), крапивница у трех детей, диарея и метеоризм у двух детей, а также в одном случае — астма. У остальных 13 из 36 обследованных детей в возрасте от 3 до 7 лет (в сыворотке крови которых указанные sIgE отсутствовали) дерматит был выявлен аллергологом в 85% случаев, в двух случаях — диарея и метеоризм, и у одного ребенка — крапивница.

Из 23 детей в возрасте от 18 до 36 месяцев sIgE были выявлены у 10 детей. У 8 детей (80%) в соответствии с записями аллерголога был дерматит, у двоих имела место крапивница, у одного ребенка отмечены диарея и метеоризм. У остальных 13 из 23 обследованных детей в возрасте старше 7 лет (в сыворотке крови которых указанные sIgE отсутствовали) дерматит был выявлен аллергологом в

ТАБЛИЦА 2. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ УРОВНЯ sIgE К АЛЛЕРГЕНУ ЦЕЛЬНОГО КОРОВЬЕГО МОЛОКА, ЕГО КОМПОНЕНТАМ, СОЕ И КЛЕЙКОВИНЕ У 52 ДЕТЕЙ РАННЕГО, ДОШКОЛЬНОГО И МЛАДШЕГО ШКОЛЬНОГО ВОЗРАСТА

TABLE 2. RESULTS OF THE STUDY OF sIgE LEVEL TO WHOLE COW'S MILK ALLERGENS, ITS COMPONENTS, SOYBEAN AND GLUTEN IN 52 CHILDREN OF EARLY, PRESCHOOL AND PRIMARY SCHOOL AGE

Дети, в сыворотке крови которых выявлены sIgE Children in the blood serum were detected sIgE	Возраст Age	Показатель Indicator	F2 цельное коровье молоко F2 milk	F76 α-лакталь-бумин F76 α-lactal-bumin	F77 β-лакто-глобулин F77 β-lacto-globulin	F78 казеин F78 casein	F231 кипяченное молоко F231 boiled milk	F236 Молочная сыворотка F236 whey	F14 соя F14 soybean	F79 клейковина F79 gluten
	n									
До 18 месяцев Under 18 months	8	Кол-во детей с уровнем sIgE от 0,15 до 100 МЕ/мл Number of children with sIgE from 0.15 to 100 IU/ml	8	8	7	6	7	8	1	2
		Max, МЕ/мл Max, IU/ml	16,40	5,60	22,80	5,94	7,84	23,60	–	31,00
		Min, МЕ/мл IU/ml	0,55	0,32	0,17	0,23	0,23	0,15	–	2,60
		M, МЕ/мл M, IU/ml	6,41	0,32	6,58	2,73	2,81	7,54	0,80	16,80
		SD, МЕ/мл SD, IU/ml	6,28	0,32	7,82	2,66	3,18	8,80	–	–
		ME, МЕ/мл ME, IU/ml	4,46	0,32	4,17	1,90	0,86	3,54	–	–
		Нет детей с уровнем sIgE > 100 МЕ/мл No children with sIgE level > 100 IU/ml	–							

Таблица 2 (продолжение)
Table 2 (continued)

Дети, в сыворотке крови которых выявлены sIgE Children in the blood serum were detected sIgE	Возраст Age	n	Показатель Indicator	F2 цельное коровье молоко F2 milk	F76 α-лакталь- бумин F76 α-lactal- bumin	F77 β-лакто- глобулин F77 β-lacto- globulin	F78 казеин F78 casein	F231 кипяченное молоко F231 boiled milk	F236 Молочная сыворожка F236 whey	F14 соя F14 soybean	F79 клейковина F79 gluten
От 18 до 36 месяцев From 18 to 36 months		11	Кол-во детей с уровнем sIgE от 0,15 до 100 МЕ/мл Number of children with sIgE from 0.15 to 100 IU/ml	6	4	5	5	5	8	2	1
			Max, ME/мл Max, IU/ml	1,78	0,86	0,90	0,48	0,56	1,39	0,19	–
			Min, ME/мл IU/ml	0,22	0,11	0,23	0,11	0,14	0,17	0,15	–
			M, ME/мл M, IU/ml	0,70	0,43	0,51	0,30	0,36	0,51	0,17	0,15
			SD, ME/мл SD, IU/ml	0,57	–	0,28	0,16	0,20	0,44	–	–
			ME, ME/мл ME, IU/ml	0,62	–	0,52	0,26	0,44	0,36	–	–
			1 ребенок с уровнем sIgE > 100 МЕ/мл 1 child with sIgE level > 100 IU/ml	> 100	65,60	14,70	> 100	> 100	26,30	3,30	42,50

Таблица 2 (продолжение)
Table 2 (continued)

Дети, в сыворотке крови которых выявлены sIgE Children in the blood serum were detected sIgE	Возраст Age	Показатель Indicator	F2 цельное коровье молоко F2 milk	F76 α-лакталь-бумин F76 α-lactal-bumin	F77 β-лакто-глобулин F77 β-lacto-globulin	F78 казеин F78 casein	F231 кипяченное молоко F231 boiled milk	F236 Молочная сыворотка F236 whey	F14 соя F14 soybean	F79 клейковина F79 gluten		
	n											
От 3 до 7 лет From 3 to 7 years	23	Кол-во детей с уровнем sIgE от 0,15 до 100 МЕ/мл Number of children with sIgE from 0.15 to 100 IU/ml	16	8	14	7	5	14	7	6		
			72,20	63,80	1,56	46,30	39,80	13,00	2,77	0,45		
			0,17	0,20	0,15	0,15	0,21	0,15	0,18	0,16		
				M, МЕ/мл M, IU/ml	4,95	8,22	0,46	6,79	8,16	1,54	0,73	0,27
			SD, МЕ/мл SD, IU/ml	17,93	22,46	0,37	17,42	17,69	3,33	0,92	0,11	
			МЕ, МЕ/мл ME, IU/ml	0,40	0,27	0,38	0,22	0,25	0,67	0,42	0,28	
		3 ребенка с уровнем sIgE > 100 МЕ/мл 3 children with sIgE level> 100 IU/ml	> 100	> 100	2,51	> 100	> 100	> 100	23,10	0,42	26,20	
			> 100	> 100	20,70	> 100	> 100	> 100	58,40	< 0,15	1,42	
			> 100	82,30	4,76	> 100	> 100	> 100	62,90	0,20	0,18	

Таблица 2 (окончание)
Table 2 (continued)

Дети, в сыворотке крови которых выявлены sIgE Children in the blood serum were detected sIgE	Возраст Age	n	Показатель Indicator	F2 цельное коровье молоко F2 milk	F76 α-лакталь- бумин F76 α-lactal- bumin	F77 β-лакто- глобулин F77 β-lacto- globulin	F78 казеин F78 casein	F231 кипяченое молоко F231 boiled milk	F236 Молочная сыворожка F236 whey	F14 соя F14 soybean	F79 клейковина F79 gluten
Старше 7 лет Older than 7 years		10	Кол-во детей с уровнем sIgE от 0,15 до 100 МЕ/мл Number of children with sIgE from 0.15 to 100 IU/ml	7	5	5	5	4	6	5	2
			Max, МЕ/мл Max, IU/ml	1,32	0,55	0,45	0,43	0,67	1,84	0,54	27,10
			Min, МЕ/мл IU/ml	0,32	0,16	0,19	0,16	0,36	0,23	0,17	0,47
			M, МЕ/мл M, IU/ml	0,71	0,36	0,36	0,32	0,48	0,64	0,36	13,79
			SD, МЕ/мл SD, IU/ml	0,41	0,18	0,12	0,11	0,14	0,60	0,15	18,83
			ME, МЕ/мл ME, IU/ml	0,60	0,31	0,43	0,34	0,45	0,42	0,37	13,79
			1 ребенок с уровнем sIgE > 100 МЕ/мл 1 child with sIgE level > 100 IU/ml	> 100	82,80	19,60	38,10	33,10	96,30	0,209	< 0,10

85% случаев, в двух случаях — ринит, у одного ребенка — крапивница и также у одного — диарея и метеоризм.

Следует особо отметить, что запоры и боли в животе были зафиксированы только у детей младше трех лет: у 6 из 22 детей (27%), в сыворотке крови которых отсутствовали sIgE, и только у двоих детей (9%) с выявленными sIgE. Причем в одном из этих двух случаев были обнаружены только sIgE к молочной сыворотке в концентрации 0,17 МЕ/мл, а в другом — максимальный уровень концентрации sIgE соответствовал клейковине (2,61 МЕ/мл у ребенка младше 18 месяцев). Таким образом, такой клинический симптом, как запоры и боли в животе, у детей до трех лет выявлялся чаще при отсутствии sIgE к цельному коровьему молоку и его компонентам.

Обсуждение

Концентрация sIgE к цельному коровьему молоку составляла > 100 МЕ/мл у пяти детей, среди которых у всех имелось сочетание очень высоких концентраций sIgE к цельному коровьему молоку, кипяченому молоку и казеину, что согласуется с данными других авторов при обследовании детей, не переносящих ни сырое, ни термически обработанное молоко [5]. Следует отметить, что уровень sIgE к альфа-лактальбумину у этих детей также был высоким и составлял от 65,6 до > 100 МЕ/мл.

Среди детей с выявленными sIgE частота выявления sIgE к аллергену цельного коровьего молока, его компонентам и клейковине не имела тенденции к уменьшению либо увеличению в зависимости от возрастной группы. Напротив, sIgE к сое были обнаружены только в одном случае у детей до 18 месяцев с ростом частоты их выявления до 50% у детей старше 7 лет (5 из десяти детей этого возраста с выявленными sIgE), что, очевидно, связано с расширением диеты.

У 7 детей, в сыворотке крови которых отсутствовали sIgE к аллергену цельного коровьего молока, нами были обнаружены sIgE к бета-лактоглобулину и/или молочной сыворотке, у 3 — к сое и/или клейковине в концентрации, соответствующей очень низкому либо низкому уровням реактивности. Среди детей с выявленными sIgE в

15 случаях (29%) уровень sIgE к цельному коровьему молоку был ниже, чем концентрация sIgE к молочной сыворотке (из них у 7 детей ниже, чем к бета-лактоглобулину) и у 4 детей (8%) — ниже, чем к сое.

Таким образом, развернутое исследование уровней sIgE к компонентам молока позволило подтвердить наличие IgE-опосредованной формы аллергии к коровьему молоку у 7% обследованных детей с симптомами пищевой аллергии, но с отсутствием sIgE к аллергену цельного коровьего молока, а также выявить 29% случаев, когда уровень sIgE к компонентам молока был выше, чем к аллергену цельного коровьего молока. Результаты исследования могут иметь практическое значение, поскольку клинико-иммунологическая форма пищевой аллергии, а также интенсивность и динамика снижения продукции sIgE, являются принятыми критериями прогноза формирования толерантности к белкам коровьего молока [4, 5]. Кроме того, выявление аллергена (в том числе, аллергена сои), вызывающего максимально интенсивную продукцию sIgE, может оказаться важным для формирования обоснованной элиминационной диеты.

Выводы

1. Диагностика аллергии к коровьему молоку и его компонентам без использования лабораторных методов представляется крайне затруднительной в связи с непатогномоничностью ее симптомов.

2. Комплексное исследование уровней sIgE к аллергену цельного коровьего молока, его компонентам, а также к сое и клейковине, повышает точность лабораторной диагностики IgE-опосредованной реакции на молоко по сравнению с определением концентрации sIgE к цельному коровьему молоку в качестве скринингового теста.

3. Наиболее значимыми аллергенами для диагностики и дифференциальной диагностики IgE-опосредованной аллергии к коровьему молоку у детей помимо аллергена «цельное коровье молоко, f2» представляются следующие аллергены: молочная сыворотка, f236», бета-лактоглобулин, f77» и «соя, f14».

Список литературы / References

1. Вишнева Е.А., Намазова-Баранова Л.С., Турти Т.В., Торшхоева Р.М., Алексеева А.А., Левина Ю.Г. Аллергия к белкам коровьего молока. Подходы и алгоритмы лечения // Вопросы современной педиатрии, 2012. Т. 11, № 3. С. 65-69. [Vishneva E.A., Namazova-Baranova L.S., Tourte T.V., Torshkhoyeva R.M., Alekseeva A.A., Levina J.G. Treatment with amino-acid-based formula of children with alimentary allergy to cow milk proteins. *Voprosy sovremennoy pediatrii = Current Pediatrics*, 2012, Vol. 11, no. 3, pp. 65-69. (In Russ.)]
2. Гервазиева В.Б., Сверановская В.В. Пищевая аллергия и повышенная чувствительность к соевым белкам // Медицинская иммунология, 2005. Т. 7, № 1. С. 15-20. [Gervazieva V.B., Sveranovskaya V.V. Alimentary allergy and hypersensitivity to soya bean proteins. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2005, Vol. 7, no. 1, pp. 15-20. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2005-1-15-20.
3. Захарова И.Н., Коровина Н.А., Малова Н.Е. Диетотерапия при непереносимости белков коровьего молока у детей раннего возраста // Вопросы современной педиатрии, 2005. Т. 4, № 1. С. 67-70. [Zaharova I.N.,

Korjvina N.A., Malova N.E. Diet therapy in cow milk protein intolerance in infants. *Voprosy sovremennoy pediatrii = Current Pediatrics*, 2005, Vol. 4, no. 1, pp. 67-70. (In Russ.)]

4. Ковязина Н.А., Алхутова Н.А., Жижина О.Л. Клинико-лабораторные аспекты выявления специфических IgE антител к коровьему молоку и его компонентам // Медицинская иммунология, 2019. Т. 21, № 5. С. 937-944. [Kovyazina N.A., Alkhutova N.A., Zhizhina O.L. Clinical and laboratory aspects of detection of specific IgE antibodies to cow's milk and its components. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2019, Vol. 21, no. 5, pp. 937-944. (In Russ.)] doi: 10/15789/1563-0625-2019-5-937-944.

5. Макарова Д.С., Намазова-Баранова Л.С., Новик Г.А., Вишнёва Е.А., Петровская М.И., Грибакин С.Г. К вопросу о продолжительности диеты при аллергии на белки коровьего молока. Как и когда снова вводить в питание ребенка молочные продукты? // Педиатрическая фармакология, 2015. Т. 12, № 3. С. 345-353. [Makarova S.G., Namazova-Baranova L.S., Novik G.A., Vishneva E.A., Petrovskaya M.I., Gribakin S.G. Concerning diet duration at cow's milk protein allergy. How and when should dairy products be introduced again? *Pediatricheskaya farmakologiya = Pediatric Pharmacology*, 2015, Vol. 12, no. 3, pp. 345-353. (In Russ.)]

6. Федотова М.М., Огородова Л.М., Фёдорова О.С., Евдокимова Т.А. Молекулярные и эпидемиологические основы аллергии к белкам коровьего молока // Бюллетень сибирской медицины, 2011. № 6. С. 86-92. [Fedotova M.M., Ogorodova L.M., Fyodorova O.S., Evdokimova T.A. Molecular and epidemiological basis of cow's milk allergy. *Byulleten sibirskoy meditsiny = Bulletin of Siberian Medicine*, 2011, no. 6, pp. 86-92. (In Russ.)].

7. Fiocchi A., Brozek J., Schünemann H., Bahna S.L., von Berg A., Beyer K., Bozzola M., Bradsher J., Compalati E., Ebisawa M., Guzmán M.A., Li H., Heine R.G., Keith P., Lack G., Landi M., Martelli A., Rancé F., Sampson H., Stein A., Terracciano L., Vieths S. World Allergy Organization (WAO) Diagnosis and Rationale for Action against Cow's Milk Allergy (DRACMA) guidelines. *Pediatr. Allergy Immunol.*, 2010, Vol. 21, Suppl. 21, Vol. 1-125.

8. Monaci L., Tregoeat V., van Hengel A.J., Anklaam E. Milk allergens, their characteristics and their detection in food: A review. *Eur. Food Research Tech.*, 2006, Vol. 223, no. 2, pp. 149-179.

9. Roberts G., Patel N., Levi-Schaffer F., Habibi P., Lack G. Food allergy as a risk-factor of life-threatening asthma in childhood a case-controlled study. *J. Allergol. Clin. Immunol.*, 2003, Vol. 112, pp. 168-177.

10. Woodcock A., Lowe L.A., Murray C.S., Simpson B.M., Pipis S.D., Kissen P. Early life environmental control: effect on symptoms, sensitization, and lung function at age 3 years. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2004. Vol. 170. pp. 433-439.

Авторы:

Ковязина Н.А. — к.м.н., заведующая лабораторией серологических исследований и аллергодиагностики отдела лабораторной диагностики ФГБУ «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А.М. Никифорова» МЧС России, Санкт-Петербург, Россия

Алхутова Н.А. — старший научный сотрудник лаборатории серологических исследований и аллергодиагностики отдела лабораторной диагностики ФГБУ «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А.М. Никифорова» МЧС России, Санкт-Петербург, Россия

Камаев А.В. — к.м.н., доцент кафедры общей врачебной практики (семейной медицины) ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Трусова О.В. — к.м.н., доцент кафедры терапии госпитальной с курсом аллергологии и иммунологии имени академика М.В. Чернуцкого ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Жижина О.Л. — к.м.н., доцент кафедры внутренних болезней ЧОУ ВО «Санкт-Петербургский медико-социальный институт», Санкт-Петербург, Россия

Егорова М.О. — д.м.н., заместитель исполнительного директора компании «ОМБ» по клинической лабораторной диагностике, «ОМБ», Санкт-Петербург, Россия

Authors:

Kovyazina N.A., PhD (Medicine), Head, Laboratory of Serological Studies and Allergodiagnosics, Department of Laboratory Diagnostics, A. Nikiforov Russian Center of Emergency and Radiation Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Alkhutova N.A., PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Serological Studies and Allergodiagnosics, Department of Laboratory Diagnostics, A. Nikiforov Russian Center of Emergency and Radiation Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Kamaev A.V., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of General Family Practice (Family Medicine), First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Trusova O.V., PhD (Medicine), Associate Professor, M. Chernorutsky Department of Hospital Therapy, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Zhizhina O.L., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Internal Medicine, St. Petersburg Medical and Social Institute, St. Petersburg, Russian Federation

Egorova M.O., PhD, MD (Medicine), Deputy Executive Director for Clinical Diagnostics, OMB Company, St. Petersburg, Russian Federation

Поступила 06.06.2019

Отправлена на доработку 19.06.2019

Принята к печати 20.09.2019

Received 06.06.2019

Revision received 19.06.2019

Accepted 20.09.2019

МИКРОВЕЗИКУЛЫ ЛЕЙКОЦИТАРНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ В ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПАЦИЕНТОК С НАРУЖНЫМ ГЕНИТАЛЬНЫМ ЭНДОМЕТРИОЗОМ

Ярмолинская М.И.¹, Дурнева Е.И.¹, Маркова К.Л.¹,
Михайлова В.А.^{1,2}, Сельков С.А.¹, Соколов Д.И.^{1,2}

¹ ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта», Санкт-Петербург, Россия

² ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Эндометриоз — хроническое гинекологическое заболевание, которое является серьезной проблемой с точки зрения диагностики и лечения. Несмотря на десятилетия исследований, нет ни специфических признаков и симптомов, ни анализов крови для клинического подтверждения диагноза, что затрудняет своевременную диагностику и лечение. Поэтому по-прежнему остается актуальным поиск новых маркеров для ранней неинвазивной диагностики заболевания. Перспективными биологическими маркерами наружного генитального эндометриоза можно считать различные субклеточные структуры, участвующие в межклеточных коммуникациях, в частности, микровезикулы. В связи с этим, целью исследования явилась оценка состава микровезикул лейкоцитарного происхождения в периферической крови пациенток с наружным генитальным эндометриозом I-II степени и возможность их использования в качестве маркеров неинвазивной диагностики перитонеальных форм эндометриоза. В исследование вошли 97 женщин с наружным генитальным эндометриозом I-II степени в возрасте от 26 до 40 лет, диагноз у которых был установлен интраоперационно и подтвержден гистологически. У всех пациенток основной группы отмечен болевой синдром, а также у 73,2% больных выявлено бесплодие. Контрольную группу составили 20 пациенток, средний возраст которых составил $25,5 \pm 1,1$ лет, обследовавшихся в связи с мужским фактором бесплодия перед проведением процедуры экстракорпорального оплодотворения, у которых на основании проведенного интраоперационного обследования не было найдено гинекологических заболеваний, а также отсутствовал болевой синдром. Перед проведением оперативного вмешательства у всех пациенток осуществлялся забор периферической крови для определения содержания микровезикул лейкоцитарного происхождения. Для выделения микровезикул использовали ранее описанный Gelderman M. и Semak J. метод. Было установлено, что для пациенток с наружным генитальным эндометриозом I-II степени характерно увеличение в периферической крови количества микровезикул с фенотипом CD14⁺, CD16⁺ и CD54⁺CD14⁺ в 1,1, 1,38 и 1,55 раза соответственно, а также снижение содержания

Адрес для переписки:

Маркова Ксения Львовна
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта»
199034, Россия, Санкт-Петербург,
Менделеевская линия, 3.
Тел.: 8 (812) 323-75-45, 328-98-50.
Факс: 8 (812) 323-75-45.
E-mail: kseniyabelyakova129@gmail.com

Address for correspondence:

Markova Kseniia L.
D. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology
199034, Russian Federation, St. Petersburg,
Mendeleevskaya line, 3.
Phone: 7 (812) 323-75-45, 328-98-50.
Fax: 7 (812) 323-75-45.
E-mail: kseniyabelyakova129@gmail.com

Образец цитирования:

М.И. Ярмолинская, Е.И. Дурнева, К.Л. Маркова, В.А. Михайлова, С.А. Сельков, Д.И. Соколов «Микровезикулы лейкоцитарного происхождения в периферической крови пациенток с наружным генитальным эндометриозом» // Медицинская иммунология, 2022. Т. 24, № 2. С. 327-336.
doi: 10.15789/1563-0625-MDF-2447
© Ярмолинская М.И. и соавт., 2022

For citation:

M.I. Yarmolinskaya, E.I. Durneva, K.L. Markova, V.A. Mikhailova, S.A. Selkov, D.I. Sokolov "Microvesicles derived from leukocytes in the peripheral blood of patients with external genital endometriosis", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2022, Vol. 24, no. 2, pp. 327-336.
doi: 10.15789/1563-0625-MDF-2447
DOI: 10.15789/1563-0625-MDF-2447

микровезикул с фенотипом CD45⁺CD4⁺, CD3⁺CD4⁺, CD3⁺CD8⁺ в 1,2, 4 и 1,5 раза соответственно, по сравнению с женщинами из группы контроля. Таким образом, у пациенток с наружным генитальным эндометриозом I-II степени повышение в периферической крови относительного количества микро-везикул с фенотипом CD54⁺CD14⁺ выше 5,22% может служить маркером для ранней неинвазивной диагностики заболевания с чувствительностью 80,5% и специфичностью 71%.

Ключевые слова: эндометриоз, неинвазивный маркер, клетки иммунной системы, микровезикулы, моноциты, NK-клетки

MICROVESICLES DERIVED FROM LEUKOCYTES IN THE PERIPHERAL BLOOD OF PATIENTS WITH EXTERNAL GENITAL ENDOMETRIOSIS

Yarmolinskaya M.I.^a, Durneva E.I.^a, Markova K.L.^a, Mikhailova V.A.^{a,b}, Selkov S.A.^a, Sokolov D.I.^{a,b}

^a D. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology, St. Petersburg, Russian Federation

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

Abstract. Endometriosis is a chronic gynecological disease, which poses a serious problem in terms of diagnosis and treatment. Despite decades of research, there are no specific signs and symptoms and no blood tests to clinically confirm the diagnosis, which makes timely diagnosis and treatment difficult. Therefore, the search for new markers for early non-invasive diagnosis of the disease remains relevant. Various subcellular structures involved in intercellular communication, in particular, microvesicles, can be considered promising biological markers for external genital endometriosis. The aim of this work was to assess the composition of microvesicles derived from leukocytes in the peripheral blood of patients with stage I-II of external genital endometriosis and the possibility of their use as markers of non-invasive diagnosis of peritoneal forms of endometriosis. The study involved 97 women aged 26–40 with stage I-II of external genital endometriosis, whose diagnosis was established intraoperatively and confirmed histologically. Pain syndrome was noted in all patients of the main group, with infertility also detected in 73.2% of the patients. The control group consisted of 20 patients, whose average age was 25.5±1.1 years, who were examined in connection with male infertility factor before the in vitro fertilization, and in whom, on the basis of intraoperative examination, presented no gynecological diseases, and no pain syndrome. Before the surgical intervention, peripheral blood was taken from all patients to determine the content of microvesicles derived from leukocytes. To isolate microvesicles, we used the previously described by M.P. Gelderman and J. Simak method. It was found that patients with stage I-II of external genital endometriosis experience an increase in the number of CD14⁺, CD16⁺ and CD54⁺CD14⁺ microvesicles in the peripheral blood by 1.1, 1.38 and 1.55 times, respectively, as well as a decrease in the number of CD45⁺CD4⁺, CD3⁺CD4⁺, CD3⁺CD8⁺ microvesicles by 1.2, 4 and 1.5 times, respectively, compared with patients from the control group. Therefore, in patients with stage I-II of external genital endometriosis, an increase in the relative number of CD54⁺CD14⁺ microvesicles in the peripheral blood above 5.22% can serve as a marker for early non-invasive diagnosis of the disease with sensitivity of 80.5% and specificity of 71%.

Keywords: endometriosis, non-invasive marker, immune system cells, microvesicles, monocytes, NK cells

The study was supported by the research project No. AAAA-A20-120041390023-5 (Plasma cryopreservation and isolation of microvesicles) and the research project No. AAAA-A20-120041390031-0 (Evaluation of phenotypic characteristics of microvesicles).

Introduction

Endometriosis is a chronic inflammatory disease characterized by the migration of endometrial cells

outside the uterine cavity. The main clinical manifestations include chronic pelvic pain, dysmenorrhea, dyspareunia and infertility. The latter is detected in 30–50% of cases, while in 20–25% of patients the disease is asymptomatic [50].

Patients with diverse manifestations of pain syndrome inherent in endometriosis are often treated by general physicians without proper therapy, since the symptoms of this disease may also be characteristic of other pathologies associated with chronic pelvic pain. Therefore, the gold standard for a definitive

diagnosis consists of surgical intervention followed by histological examination [2]. Under these conditions, a significant delay in diagnosis leads to 8-12 years of delayed appropriate treatment [10, 31]. At the moment, there are no reliable laboratory biomarkers for this gynecological pathology. The increased prevalence of endometriosis in women requires the development of new non-invasive diagnostic biomarkers for faster diagnosis, appropriate treatment and selection of potential patients for surgery [3, 20]. Therefore, a biomarker or a panel of biomarkers found in the biological fluids of affected patients may be an appropriate tool for diagnosing endometriosis, as well as an objective assessment of the effectiveness of treatment.

One of the new biomedicine directions is the study of the phenomenon of microvesicle formation by eukaryotic cells and their role in intercellular interactions. Almost all types of cells are capable of releasing microvesicles into the intercellular space after their activation or death due to apoptosis. Depending on their formation, microvesicles may differ in biochemical composition and biological properties [19]. They function as transporters of biologically active molecules between cells, and participate in the regulation of various processes, in particular, inflammation, hemocoagulation, vascular reactions, apoptosis and cell proliferation [24]. Endometriosis is accompanied by a chronic inflammatory reaction, which is characterized by a decrease in the activity of cytotoxic T cells and NK cells, a change in the secretion of cytokines by T helper [35] cells, and possibly the formation of microvesicles by leukocytes. Currently, there is a limited number of studies on the composition of microvesicles in the peripheral blood of patients with endometriosis. Thus, in one of the studies, higher levels of circulating microvesicles were found in patients with deep infiltrative endometriosis compared with patients with endometriomas and without this disease, which can be explained by a more intense inflammatory reaction and angiogenesis in this aggressive form of endometriosis. These results show that the levels of circulating microvesicles may play a role in the pathophysiological mechanisms of deep infiltrative endometriosis [29]. The same group of authors conducted a pilot study in 2019 in patients with endometriomas. The authors showed, that the number of microvesicles present in the peripheral blood increased after removal of endometriomas by the excision method, but not when using laser ablation. The increase in the level of circulating microvesicles is temporary and it returns to the basal level three months after the removal procedure. These results show that the excision method causes a more pronounced short-term inflammatory response when compared with that resulting from laser vaporization [30]. In this

regard, the study of the composition of microvesicles derived from leukocytes present in the peripheral blood of patients with endometriosis seems relevant for understanding the pathogenesis of the disease and developing new approaches to both the diagnosis of the disease itself and for monitoring the effectiveness of treatment and predicting the risk of possible relapses.

In connection with the above, **the purpose of this study** was to assess the composition of microvesicles derived from leukocytes in the peripheral blood of patients with stage I-II of external genital endometriosis and the possibility of their use as markers of non-invasive diagnosis of peritoneal forms of endometriosis.

Materials and methods

A study was conducted among 97 women aged 26-40 years (average age 29.3 ± 1.4 years) with stage I-II of external genital endometriosis. Inclusion criteria: age 18-40 years, first-time intraoperatively verified diagnosis of stage I-II of external genital endometriosis confirmed by histological examination, the presence of pain syndrome (pain in the pelvic region, pain during menstruation, pain during sexual activity), signing of voluntary informed consent to participate in the study. Exclusion criteria: decompensation of chronic somatic diseases, acute infectious diseases or exacerbation of their chronic forms, uterine fibroids, polycystic ovarian syndrome, taking immunomodulatory and hormonal medications three months before surgery for endometriosis, acute-stage pelvic inflammatory diseases, autoimmune diseases.

All patients of the main group were diagnosed intraoperatively with external genital endometriosis, which was confirmed by histological examination. When using the r-ASRM classification in this group of patients, it was revealed that the stage I of external genital endometriosis was present in 43.3% (42) of patients, stage II of external genital endometriosis – in 56.7% (55) of patients. Pain syndrome (algodismenorrhea, pelvic pain and dyspareunia) was noted in all patients and was the most common reason women consulted a gynecologist for examination. At the same time, before the start of the therapy, complaints of chronic pelvic pain were noted in 90.7% (88) of patients with endometriosis, while algodismenorrhea occurred in 93.8% (91) of patients with endometriosis, and dyspareunia was observed in 70.1% (68) of patients with endometriosis. A combination of three types of pain occurred in 72.2% (70) of patients. A visual analog pain scale was used to assess the pain syndrome. The severity of pelvic pain in patients with stage III of external genital endometriosis was 6.8 ± 0.3 points, algodismenorrhea – 8.2 ± 0.4 points, and dyspareunia – 5.3 ± 0.6 points.

The second most important clinical symptom of endometriosis was infertility, which occurred in

73.2% (71) of patients, while primary infertility was observed in 69% (49) of patients, the proportion of secondary infertility was 31% (22) of patients. The duration of primary infertility in patients with external genital endometriosis was 5.3 ± 2.2 years, secondary – 4.5 ± 1.8 years.

The control group consisted of 20 patients, whose average age was 25.5 ± 1.1 years (minimum – 21.2 years, maximum – 33 years), who were examined in connection with male infertility factor before the in vitro fertilization, and in whom, on the basis of intraoperative examination, presented no gynecological diseases, and no pain syndrome.

Before the surgical intervention, peripheral blood was taken from all patients to determine the content of microvesicles derived from leukocytes. To isolate microvesicles, the method described by M.P. Gelderman and J. Simak was used [13]. All solutions for working with microvesicles were filtered in advance through an ultrafilter with a pore diameter of 0.2 microns (Corning, USA).

For long-term storage of microvesicles obtained from peripheral blood, we used the plasma cryopreservation method developed by us (patent RU 2746950). The plasma samples were stored in liquid nitrogen in a Dewar flask at -196°C and thawed immediately. The procedure was performed in a water bath at 37°C . Further, the resulting plasma was centrifuged for 20 minutes at $19800\text{ g} + 10^\circ\text{C}$ in order to precipitate microvesicles. Further, the obtained microvesicles were washed with a cold Hanks' solution without CaCl_2 (Sigma, USA) containing sodium heparin at a concentration of 30 IU/mL of solution by centrifugation for 20 minutes at $19800\text{ g} + 10^\circ\text{C}$. The resulting microvesicle precipitate was resuspended in Hanks' solution (BioloT, Russia) containing 0.35% of serum albumin (Sigma, USA) and heparin sodium at a concentration of 30 IU per 1 mL of solution, and treated with antibodies to CD4, CD3, CD8, CD45, CD41a, CD14, CD54, CD56 and CD16 (R&D Systems, USA) in accordance with the manufacturer's recommendations. The expression of these markers was analyzed, both individually and in various combinations. The expression of these markers was assessed using the BD FACS Canto II flow cytofluorimeter (BD, USA). In terms of light scattering, microvesicle gate was isolated using polystyrene beads calibrated in sizes of 1.0 microns and 0.2 microns (Invitrogen, USA). Isotypic controls (R&D, USA) were used for gating microvesicles according to fluorescence indicators. Staining with CD41a antibodies was used to separate platelets and their microvesicles, the assessment of which was not part of the objectives of this study.

Statistical processing of data was carried out using nonparametric analysis methods. Accumulation, correction, systematization of the initial information

and visualization of the results were carried out in Microsoft Office Excel 2007 spreadsheets. Statistical analysis was carried out using the STATISTICA v. 10.0 software (Statsoft Inc., Tulsa, USA). The critical confidence level of the null hypothesis was assumed to be equal to a probability of at least 95% ($p < 0.05$). Quantitative indicators were evaluated for compliance with the normal distribution. For this purpose, the Shapiro–Wilk's test was used (with the number of patients under study less than 50). The distribution of quantitative indicators differed from normal, and therefore the values of the median (Me), lower and upper quartiles ($Q_{0.25}$ – $Q_{0.75}$) were used. The Mann–Whitney U test was used to compare independent aggregates.

Results

In the peripheral blood of patients with endometriosis, an increase in the intensity of CD16^+ molecules expression on the surface of microvesicles by 1.38 times was shown, as well as an increase in the relative content of microvesicles with CD14^+ receptor on their surface by 1.1 times compared with these indicators in patients without the disease (Figures 1, 2).

Patients with stage I and stage II of external genital endometriosis are also characterized by a decrease in the relative content of microvesicles with $\text{CD45}^+\text{CD4}^+$, $\text{CD3}^+\text{CD4}^+$ and $\text{CD3}^+\text{CD8}^+$ antigens on their surface by 1.2, 4 and 1.5 times, respectively, as well as an increase in the relative content of microvesicles with $\text{CD54}^+\text{CD14}^+$ receptors by 1.55 times compared with these indicators in patients from the control group (Figure 3).

To assess the diagnostic effectiveness of the prognostic model of the relationship between the content of CD14^+ , CD16^+ and $\text{CD54}^+\text{CD14}^+$ microvesicles in the peripheral blood and external genital endometriosis, we used the method of constructing a curve of mutual dependence of the probabilities of false positive and true positive results (ROC curve). The area under the ROC curve of the corresponding relationship between the prognosis of external genital endometriosis and the content of $\text{CD54}^+\text{CD14}^+$ microvesicles in blood plasma was 0.7 ± 0.056 with 95% CI: 0.59–0.81 (Figure 4). The resulting model corresponds to good predictive quality and is statistically significant ($p < 0.01$). The threshold value of the content of $\text{CD54}^+\text{CD14}^+$ microvesicles at the classification threshold point is 5.22%. The relative content of $\text{CD54}^+\text{CD14}^+$ microvesicles in blood plasma equal to 5.22% or exceeding this value corresponds to the prognosis of the presence of external genital endometriosis. The sensitivity and specificity of the method were 80.5% and 71%, respectively. The areas under the ROC curve corresponding to the relationship between the prognosis of external genital

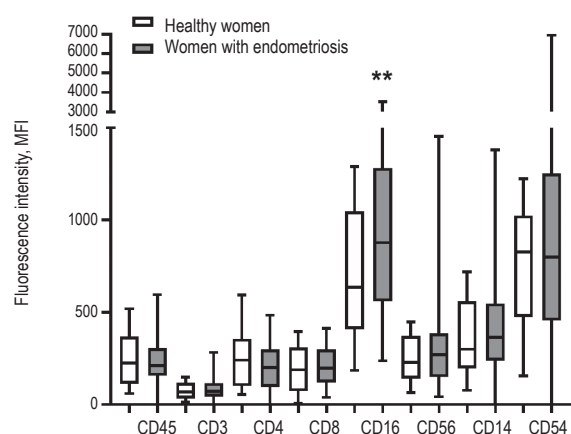


Figure 1. Intensity of surface markers expression on peripheral blood microvesicles in patients with external genital endometriosis compared with the control group

Note. **, $p < 0.01$, the group of patients with external genital endometriosis differs from the control group.

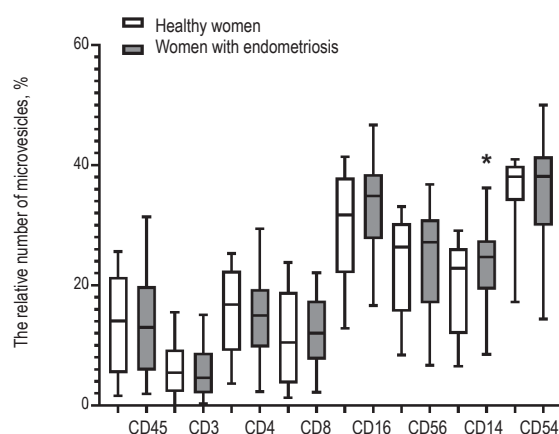


Figure 2. Relative content of microvesicles in the peripheral blood of patients with external genital endometriosis compared with patients from the control group

Note. *, $p < 0.05$, the group of patients with external genital endometriosis differs from the group of healthy patients.

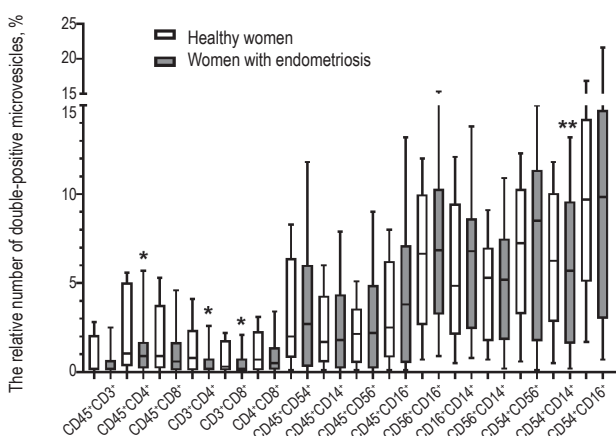


Figure 3. Relative content of microvesicles in the peripheral blood of patients with external genital endometriosis expressing various combinations of leukocyte markers compared with patients from the control group

Note. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$, the group of patients with external genital endometriosis differs from the control group.

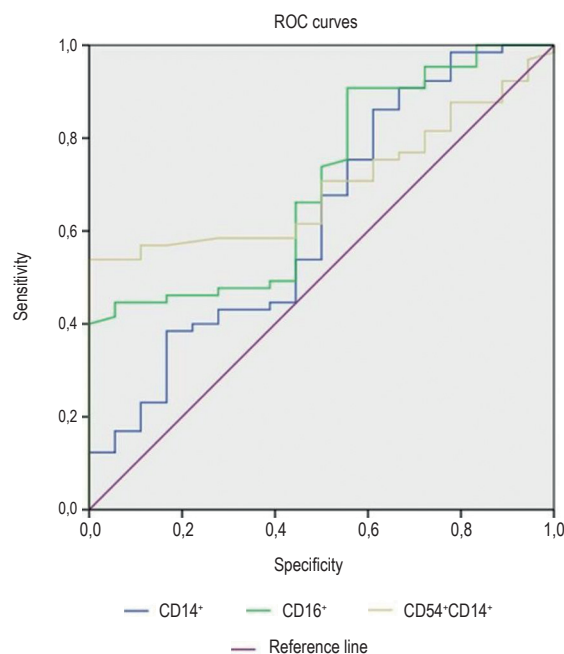


Figure 4. ROC-curves of the relationship between the content of CD14⁺, CD16⁺ and CD54⁺CD14⁺ microvesicles in the peripheral blood and external genital endometriosis

endometriosis and the content of CD14⁺ and CD16⁺ microvesicles in blood plasma were: 0.6 ± 0.078 with 95% CI: 0.47-0.78 and 0.7 ± 0.066 with 95% CI: 0.58-0.84, respectively (Figure 4). The obtained models also have good predictive quality, however, they are statistically insignificant.

Discussion

Microvesicles are extracellular structures surrounded by a bilipid membrane, specific transport

systems capable of transferring biologically active substances and genetic material between cells [1]. At the moment, they are considered as the most important regulators of intercellular interactions [27] and participants in physiological and pathophysiological processes [5]. It is assumed that microvesicles can act as diagnostic markers indicating for various diseases [7].

The leukocyte surface markers identified in this study are not narrowly specific. Their expression is

TABLE 1. ANTIGENS ON THE SURFACE OF THE MAIN POPULATIONS OF LEUKOCYTES IN THE PERIPHERAL BLOOD

Antigens on the surface of leukocytes	Main populations of peripheral blood leukocytes, the surface of which carries these antigens
CD45	All leukocytes [34]
CD3	T lymphocytes [15], NKT cells [21]
CD4	T helper lymphocytes, regulatory T lymphocytes [6]
CD8	Cytotoxic T lymphocytes [42]
CD16	NK cells [42], monocytes [36], neutrophils [46]
CD56	NK cells, NKT cells [44], monocytes [11]
CD14	Neutrophils [16], monocytes [47]
CD54	T lymphocytes [43], monocytes [33], NK cells [45]
CD45 ⁺ CD3 ⁺	T lymphocytes [38]
CD45 ⁺ CD4 ⁺	T helper lymphocytes, regulatory T lymphocytes [17]
CD45 ⁺ CD8 ⁺	Cytotoxic T lymphocytes [33]
CD3 ⁺ CD4 ⁺	T helper lymphocytes [18]
CD3 ⁺ CD8 ⁺	Cytotoxic T lymphocytes [49]
CD4 ⁺ CD8 ⁺	Immature T lymphocytes
CD45 ⁺ CD54 ⁺	T lymphocytes, monocytes, NK cells
CD45 ⁺ CD14 ⁺	Neutrophils, monocytes
CD45 ⁺ CD56 ⁺	NK cells, NKT cells [44], monocytes [11]
CD45 ⁺ CD16 ⁺	Neutrophils [9], monocytes [17], NK cells [48]
CD56 ⁺ CD16 ⁺	NK cells [26]
CD16 ⁺ CD14 ⁺	Monocytes [23]
CD56 ⁺ CD14 ⁺	Monocytes [25]
CD54 ⁺ CD56 ⁺	NK cells [39]
CD54 ⁺ CD14 ⁺	Monocytes [33]

characteristic of several types of cells present in the peripheral blood (Table 1).

We found that external genital endometriosis is accompanied by an increase in the number of microvesicles in the peripheral blood that express surface markers such as CD14⁺ and CD16⁺, as well as a combination of CD54⁺CD14⁺ antigens on their surface. Monocytes and neutrophils are the source of CD14⁺, CD16⁺ and CD54⁺CD14⁺ microvesicles. In addition, CD16⁺ microvesicles can also be secreted by NK cells (Table 1).

Monocytes, neutrophils and NK cells are known to be involved in the pathogenesis of endometriosis. It was found, that the pancreas of patients with external genital endometriosis is characterized by increased neutrophil infiltration compared with patients without this disease [40]. This is probably the result of an increased concentration of a potent neutrophil chemoattractant, such as IL-8, which is present in the plasma and in the peritoneal fluid of patients with endometriosis [28]. Therefore, an increase in the number of microvesicles with surface

markers inherent in neutrophils probably indicates the activation of these cells and the severity of the inflammatory process in endometriosis.

Activated macrophages, whose precursors are monocytes, participate in the pathogenesis of endometriosis due to the secretion of soluble mediators, such as cytokines, prostaglandins, complement components and enzymes. Through the production of these immunomediators, macrophages can cause inflammation, tissue repair, neovascularization, and also promote the attraction of fibroblasts and endothelial cells [35]. Thus, the pancreatic macrophages in patients with endometriosis have an increased ability to produce MCP-1, which plays a role in attracting peripheral blood monocytes to areas of damage and inflammation [4].

The prognostic significance of the model of the relationship between the content of CD54⁺CD14⁺ microvesicles in the peripheral blood and external genital endometriosis based on the construction of the ROC curve, makes it possible to use microvesicles only with the above phenotype as a non-invasive diagnostic marker for the diagnosis of external genital endometriosis. The content of CD54⁺CD14⁺ microvesicles in blood plasma equal to or exceeding 5.22% (classification threshold point) corresponds to the prediction of the presence of external genital endometriosis with 80.5% sensitivity and 71% specificity.

NK cells are lymphocytes of innate immunity that have a cytotoxic effect against a variety of target cells and secrete cytokines, that are also involved in the pathogenesis of genital endometriosis [12]. NK cells are able to distinguish between damaged cells by expressing inhibitory and activating receptors. One of these activating receptors is CD16, which is able to bind with cells coated with immunoglobulin G (IgG) and initiate antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity of NK cells [37]. The increased number of microvesicles with CD16⁺ receptor in the peripheral blood of patients with external genital endometriosis indicates an increase in the content of activated NK cells. However, this does not coincide with the literature data on a decrease in the cytotoxic activity of NK cells in patients diagnosed with external genital endometriosis. It is possible, that the number of CD16⁺ microvesicles in the peripheral blood of patients with endometriosis increases due to the activation of CD16⁺, which belong to uterine NK cells, as part of uterine NK cells migrates from the peripheral blood. It has been shown, that the number of cytotoxic CD16⁺ uterine NK cells in the eutopic endometrium is increased in patients with external genital endometriosis compared with fertile patients from the control group [14]. This indicates, that altered uterine NK cells in patients with endometriosis can cause an excessive inflammatory

environment during implantation or decidualization, which in turn increases the risk of infertility and miscarriage [14]. This is also confirmed by our results, according to which 73.3% of patients with external genital endometriosis had primary infertility.

In the peripheral blood of patients with endometriosis, a decrease in the content of microvesicles with the CD45⁺CD4⁺ (T helpers, regulatory T lymphocytes), CD3⁺CD4⁺ (T helpers), CD3⁺CD8⁺ (cytotoxic lymphocytes) phenotypes was also detected (Table 1). T lymphocytes are a subpopulation of adaptive immunity that play an important role in the survival and proliferation of endometrial cells [32]. Studies, in which T lymphocytes were assessed in patients with endometriosis, showed a higher CD4/CD8 ratio and an increased concentration of each subgroup in the peritoneal fluid of these patients [41]. A higher concentration of T lymphocytes was detected in endometrioid heterotopias compared with eutopic endometrium, but with a similar CD4/CD8 ratio. An increase in the total number of T lymphocytes was noted in the peripheral blood of patients with external genital endometriosis, but no differences in the CD4/CD8 ratio were detected [35]. Another important subgroup of T lymphocytes are regulatory T cells (Tregs). They are considered as powerful suppressors of the immune response and are responsible for maintaining the antigen-specific tolerance and immune homeostasis [22]. The published systematic review assessed the role of Tregs in endometriosis. The authors concluded, that a higher concentration of Tregs and/or expression of their markers can be observed in the pancreas and endometrioid heterotopias of patients with external genital endometriosis compared with patients from the control group. However, there is no consensus on the concentration of Tregs in the eutopic endometrium and peripheral blood of patients with external genital endometriosis [8]. Thus, the reduced number of microvesicles secreted by T helpers, regulatory T lymphocytes and cytotoxic lymphocytes may indicate a decrease in their activation and a decrease in cytotoxic action against cells of endometrioid heterotopias.

Conclusion

The study of the phenomenon of the formation of microvesicles by eukaryotic cells in the peripheral blood of patients with endometriosis is a promising direction for understanding the pathogenesis of the disease, developing markers for its diagnosis and monitoring the effectiveness of treatment. Our results on the increase in the number of CD14⁺ and CD16⁺ microvesicles in the peripheral blood of patients with stage I and stage II external genital endometriosis and the decrease in the number of CD45⁺CD4⁺, CD3⁺CD4⁺, CD3⁺CD8⁺ microvesicles inherent in

neutrophils, NK cells, T helpers, regulatory T lymphocytes, and cytotoxic lymphocytes, respectively, indicate a possible involvement of these microvesicles in the development and progression of endometriosis and require further study. Since it is precisely these cells of the immune system that play a key role in

the pathogenesis of the disease by participating in the implementation of the inflammatory process. The increase in the relative number of CD54⁺CD14⁺ microvesicles in the peripheral blood of patients with stage I-II of external genital endometriosis can serve as a marker for early non-invasive diagnosis of the disease.

References

1. Abels E.R., Breakefield X.O. Introduction to Extracellular Vesicles: Biogenesis, RNA Cargo Selection, Content, Release, and Uptake. *Cell. Mol. Neurobiol.*, 2016, Vol. 36, no. 3, pp. 301-312.
2. Agarwal S.K., Chapron C., Giudice L.C., Laufer M.R., Leyland N., Missmer S.A., Singh S.S., Taylor H.S. Clinical diagnosis of endometriosis: a call to action. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 2019, Vol. 220, no. 4, pp. 354 e1-354 e12.
3. Ahn S.H., Singh V., Tayade C. Biomarkers in endometriosis: challenges and opportunities. *Fertil. Steril.*, 2017, Vol. 107, no. 3, pp. 523-532.
4. Akoum A., Kong J., Metz C., Beaumont M.C. Spontaneous and stimulated secretion of monocyte chemotactic protein-1 and macrophage migration inhibitory factor by peritoneal macrophages in women with and without endometriosis. *Fertil. Steril.*, 2002, Vol. 77, no. 5, pp. 989-994.
5. Antonyak M.A., Cerione R.A. Microvesicles as mediators of intercellular communication in cancer. *Methods Mol. Biol.*, 2014, Vol. 1165, no. pp. 147-173.
6. Caza T., Landas S. Functional and phenotypic plasticity of CD4(+) T Cell subsets. *Biomed Res. Int.*, 2015, Vol. 2015, 521957. doi: 10.1155/2015/521957.
7. D'Souza-Schorey C., Clancy J.W. Tumor-derived microvesicles: shedding light on novel microenvironment modulators and prospective cancer biomarkers. *Genes Dev.*, 2012, Vol. 26, no. 12, pp. 1287-1299.
8. de Barros I.B.L., Malvezzi H., Gueuvoghlian-Silva B.Y., Piccinato C.A., Rizzo L.V., Podgaec S. What do we know about regulatory T cells and endometriosis? A systematic review. *J. Reprod. Immunol.*, 2017, Vol. 120, pp. 48-55.
9. Eksioglu-Demiralp E., Direskeneli H., Kibaroglu A., Yavuz S., Ergun T., Akoglu T. Neutrophil activation in Behcet's disease. *Clin. Exp. Rheumatol.*, 2001, Vol. 19, no. 5, Suppl. 24, pp. S19-S24.
10. Fassbender A., Burney R.O., O D.F., D'Hooghe T., Giudice L. Update on biomarkers for the detection of endometriosis. *Biomed Res. Int.*, 2015, Vol. 2015, 130854. doi: 10.1155/2015/130854.
11. Friedrich K., Sommer M., Strobel S., Thrum S., Bluher M., Wagner U., Rossol M. Perturbation of the monocyte compartment in human obesity. *Front. Immunol.*, 2019, Vol. 10, 1874. doi: 10.3389/fimmu.2019.01874.
12. Fukui A., Mai C., Saeki S., Yamamoto M., Takeyama R., Kato T., Ukita Y., Wakimoto Y., Yamaya A., Shibahara H. Pelvic endometriosis and natural killer cell immunity. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 2021, Vol. 85, no. 4, e13342. doi: 10.1111/aji.13342.
13. Gelderman M.P., Simak J. Flow cytometric analysis of cell membrane microparticles. *Methods Mol. Biol.*, 2008, Vol. 484, pp. 79-93.
14. Giuliani E., Parkin K.L., Lessey B.A., Young S.L., Fazleabas A.T. Characterization of uterine NK cells in women with infertility or recurrent pregnancy loss and associated endometriosis. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 2014, Vol. 72, no. 3, pp. 262-269.
15. Hara S., Yokote T., Akioka T., Miyoshi T., Ikemoto T., Tanaka H., Takubo T., Tsuji M., Hanafusa T. Flow cytometric immunophenotyping of peripheral T cell neoplasms using CD3 gating. *Acta Haematol.*, 2009, Vol. 121, no. 1, pp. 11-18.
16. Haziot A., Tsuberi B.Z., Goyert S.M. Neutrophil CD14: biochemical properties and role in the secretion of tumor necrosis factor-alpha in response to lipopolysaccharide. *J. Immunol.*, 1993, Vol. 150, no. 12, pp. 5556-5565.
17. Heimbeck I., Hofer T.P., Eder C., Wright A.K., Frankenberger M., Marei A., Boghdadi G., Scherberich J., Ziegler-Heitbrock L. Standardized single-platform assay for human monocyte subpopulations: Lower CD14⁺CD16⁺⁺ monocytes in females. *Cytometry A*, 2010, Vol. 77, no. 9, pp. 823-830.
18. Hillel A.T., Ding D., Samad I., Murphy M.K., Motz K. T-Helper 2 Lymphocyte immunophenotype is associated with iatrogenic laryngotracheal stenosis. *Laryngoscope*, 2019, Vol. 129, no. 1, pp. 177-186.
19. Hussein M.N.A., Boing A.N., Sturk A., Hau C.M., Nieuwland R. Inhibition of microparticle release triggers endothelial cell apoptosis and detachment. *Thromb. Haemost.*, 2007, Vol. 98, no. 5, pp. 1096-1107.
20. Irungu S., Mavrellos D., Worthington J., Blyuss O., Saridogan E., Timms J.F. Discovery of non-invasive biomarkers for the diagnosis of endometriosis. *Clin. Proteomics*, 2019, Vol. 16, 14. doi: 10.1186/s12014-019-9235-3.
21. Jakel C.E., Schmidt-Wolf I.G. An update on new adoptive immunotherapy strategies for solid tumors with cytokine-induced killer cells. *Expert Opin. Biol. Ther.*, 2014, Vol. 14, no. 7, pp. 905-916.
22. Khan K.N., Yamamoto K., Fujishita A., Muto H., Koshiba A., Kuroboshi H., Saito S., Teramukai S., Nakashima M., Kitawaki J. Differential levels of regulatory t cells and t-helper-17 cells in women with early and advanced endometriosis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2019, Vol. 104, no. 10, pp. 4715-4729.

23. Kunnathully V., Gomez-Lira M., Bassi G., Poli F., Zoratti E., La Verde V., Idolazzi L., Gatti D., Viapiana O., Adami S., Rossini M. CD14(++) CD16(-) monocytes are the main source of IL-1 β -HSD type 1 after IL-4 stimulation. *Int. Immunopharmacol.*, 2017, Vol. 43, pp. 156-163.
24. Lee T.H., D'Asti E., Magnus N., Al-Nedawi K., Meehan B., Rak J. Microvesicles as mediators of intercellular communication in cancer – the emerging science of cellular 'debris'. *Semin. Immunopathol.*, 2011, Vol. 33, no. 5, pp. 455-467.
25. Li Y.N., Zhou L.X., Fang B., Mao K.J., Wen W.B., Yu T.O., Zou Y.C., Li W.Y., Li C. Human leucocyte antigen-DR expression on CD14(+) monocytes and its relationships with multiple organ dysfunction syndrome in severe sepsis. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*, 2009, Vol. 29, no. 7, pp. 1372-1374.
26. Ma M., Yin X., Zhao X., Guo C., Zhu X., Liu T., Yang M., Zhang Z., Fu Y., Liu J., Xu J., Ding H., Han X., Chu Z., Shang H., Jiang Y. CD56(-) CD16(+) NK cells from HIV-infected individuals negatively regulate IFN- γ production by autologous CD8(+) T cells. *J. Leukoc. Biol.*, 2019, Vol. 106, no. 6, pp. 1313-1323.
27. Mause S.F., Weber C. Microparticles: protagonists of a novel communication network for intercellular information exchange. *Circ. Res.*, 2010, Vol. 107, no. 9, pp. 1047-1057.
28. Monsanto S.P., Edwards A.K., Zhou J., Nagarkatti P., Nagarkatti M., Young S.L., Lessey B.A., Tayade C. Surgical removal of endometriotic lesions alters local and systemic proinflammatory cytokines in endometriosis patients. *Fertil. Steril.*, 2016, Vol. 105, no. 4, pp. 968-977 e5.
29. Munros J., Martinez-Zamora M.A., Tassies D., Coloma J.L., Torrente M.A., Reverter J.C., Carmona F., Balasch J. Total circulating microparticle levels are increased in patients with deep infiltrating endometriosis. *Hum. Reprod.*, 2017, Vol. 32, no. 2, pp. 325-331.
30. Munros J., Martinez-Zamora M.A., Tassies D., Reverter J.C., Rius M., Gracia M., Ros C., Carmona F. Total circulating microparticle levels after laparoscopic surgical treatment for endometrioma: a pilot, prospective, randomized study comparing stripping with CO₂ laser vaporization. *J. Minim. Invasive Gynecol.*, 2019, Vol. 26, no. 3, pp. 450-455.
31. Nnoaham K.E., Hummelshoj L., Webster P., d'Hooghe T., de Cicco Nardone F., de Cicco Nardone C., Jenkinson C., Kennedy S.H., Zondervan K.T., World Endometriosis Research Foundation Global Study of Women's Health consortium. Impact of endometriosis on quality of life and work productivity: a multicenter study across ten countries. *Fertil. Steril.*, 2011, Vol. 96, no. 2, pp. 366-373 e8.
32. Osuga Y., Koga K., Hirota Y., Hirata T., Yoshino O., Taketani Y. Lymphocytes in endometriosis. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 2011, Vol. 65, no. 1, pp. 1-10.
33. Rajamanickam A., Munisankar S., Dolla C., Menon P.A., Nutman T.B., Babu S. Helminth coinfection alters monocyte activation, polarization, and function in latent mycobacterium tuberculosis infection. *J. Immunol.*, 2020, Vol. 204, no. 5, pp. 1274-1286.
34. Rheinlander A., Schraven B., Bommhardt U. CD45 in human physiology and clinical medicine. *Immunol. Lett.*, 2018, Vol. 196, pp. 22-32.
35. Riccio L., Santulli P., Marcellin L., Abrao M.S., Batteux F., Chapron C. Immunology of endometriosis. *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.*, 2018, Vol. 50, pp. 39-49.
36. Roy-Chowdhury E., Brauns N., Helmke A., Nordlohne J., Brasen J.H., Schmitz J., Volkmann J., Fleig S.V., Kusche-Vihrog K., Haller H., von Vietinghoff S. Human CD16⁺ monocytes promote a pro-atherosclerotic endothelial cell phenotype via CX3CR1-CX3CL1 interaction. *Cardiovasc. Res.*, 2021, Vol. 117, no. 6, pp. 1510-1522.
37. Sciezynska A., Komorowski M., Soszynska M., Malejczyk J. NK Cells as potential targets for immunotherapy in endometriosis. *J. Clin. Med.*, 2019, Vol. 8, no. 9, 1468. doi: 10.3390/jcm8091468.
38. Suades R., Padro T., Alonso R., Lopez-Miranda J., Mata P., Badimon L. Circulating CD45⁺/CD3⁺ lymphocyte-derived microparticles map lipid-rich atherosclerotic plaques in familial hypercholesterolaemia patients. *Thromb. Haemost.*, 2014, Vol. 111, no. 1, pp. 111-121.
39. Sun R., Fan J., Wei H., Zhang C., Tian Z. Use of interleukin-15 for preparation of adherent NK cells from human peripheral blood: comparison with interleukin-2. *J. Immunol. Methods*, 2003, Vol. 279, no. 1-2, pp. 79-90.
40. Symons L.K., Miller J.E., Kay V.R., Marks R.M., Liblik K., Koti M., Tayade C. The immunopathophysiology of endometriosis. *Trends Mol. Med.*, 2018, Vol. 24, no. 9, pp. 748-762.
41. Szylllo K., Tchorzewski H., Banasik M., Glowacka E., Lewkowicz P., Kamer-Bartosinska A. The involvement of T lymphocytes in the pathogenesis of endometriotic tissues overgrowth in women with endometriosis. *Mediators Inflamm.*, 2003, Vol. 12, no. 3, pp. 131-138.
42. Taniuchi I. CD4 Helper and CD8 cytotoxic t cell differentiation. *Annu. Rev. Immunol.*, 2018, Vol. 36, pp. 579-601.
43. Tohma S., Ramberg J.E., Lipsky P.E. Expression and distribution of CD11a/CD18 and CD54 during human T cell-B cell interactions. *J. Leukoc. Biol.*, 1992, Vol. 52, no. 1, pp. 97-103.
44. van Acker H.H., Capsomidis A., Smits E.L., van Tendeloo V.F. CD56 in the immune system: more than a marker for cytotoxicity? *Front. Immunol.*, 2017, Vol. 8, 892. doi: 10.3389/fimmu.2017.00892.
45. Wang X.Q., Hu M., Chen J.M., Sun W., Zhu M.B. Effects of gene polymorphism and serum levels of IL-2 and IL-6 on endometriosis. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.*, 2020, Vol. 24, no. 9, pp. 4635-4641.
46. Wright H.L., Moots R.J., Bucknall R.C., Edwards S.W. Neutrophil function in inflammation and inflammatory diseases. *Rheumatology (Oxford)*, 2010, Vol. 49, no. 9, pp. 1618-1631.

47. Wu J., Gong R.L., Hu Q.F., Chen X.T., Zhao W., Chen T.X. Immunoregulatory effect of human beta-defensin 1 on neonatal cord blood monocyte-derived dendritic cells and T cells. *Mol. Immunol.*, 2019, Vol. 109, no. pp. 99-107.
48. Xu X., Chong A.S. Cross-linking of CD45 on NK cells stimulates p56lck-mediated tyrosine phosphorylation and IFN-gamma production. *J. Immunol.*, 1995, Vol. 155, no. 11, pp. 5241-5248.
49. Zdzienicka H.A., Ernerudh J., Holt P.G., Nilsson J., Björkstén B. Expression of the T-cell markers CD3, CD4 and CD8 in healthy and atopic children during the first 18 months of life. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 1999, Vol. 119, no. 1, pp. 6-12.
50. Zondervan K.T., Becker C.M., Koga K., Missmer S.A., Taylor R.N., Vignani P. Endometriosis. *Nat. Rev. Dis. Primers*, 2018, Vol. 4, no. 1, 9. doi: 10.1038/s41572-018-0008-5.

Авторы:

Ярмолинская М.И. — д.м.н., профессор, профессор РАН, руководитель отдела гинекологии и эндокринологии, руководитель центра «Диагностики и лечения эндометриоза» ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта», Санкт-Петербург, Россия

Дурнева Е.И. — сотрудник отдела гинекологии и эндокринологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта», Санкт-Петербург, Россия

Маркова К.Л. — младший научный сотрудник лаборатории межклеточных взаимодействий, отдел иммунологии и межклеточных взаимодействий ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта», Санкт-Петербург, Россия

Михайлова В.А. — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории межклеточных взаимодействий, отдел иммунологии и межклеточных взаимодействий ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта»; старший преподаватель ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Сельков С.А. — д.м.н., профессор, заслуженный деятель науки РФ, руководитель отдела иммунологии и межклеточных взаимодействий ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта», Санкт-Петербург, Россия

Соколов Д.И. — д.б.н., заведующий лабораторией межклеточных взаимодействий, отдел иммунологии и межклеточных взаимодействий ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта»; доцент ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Authors:

Yarmolinskaya M.I., PhD, MD (Medicine), Professor, Russian Academy of Sciences, Head, Department of Gynecology and Endocrinology; Head, Center "Diagnostics and Treatment of Endometriosis", D. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology, St. Petersburg, Russian Federation

Durneva E.I., Research Associate, Department of Gynecology and Endocrinology; D. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology, St. Petersburg, Russian Federation

Markova K.L., Junior Research Associate, Laboratory of Cell Interactions, Department of Immunology and Cell Interactions, D. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology, St. Petersburg, Russian Federation

Mikhailova V.A., PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Cell Interactions, Department of Immunology and Cell Interactions, D. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology; Senior Lecturer, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Selkov S.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Honored Scientist of Russian Federation, Head, Department of Immunology and Cell Interactions, D. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology, St. Petersburg, Russian Federation

Sokolov D.I., PhD, MD (Biology), Head, Laboratory of Cell Interactions, D. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology; Associate Professor, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

ОСОБЕННОСТИ ГУМОРАЛЬНОГО ИММУНИТЕТА ПОСЛЕ ПЕРЕНЕСЕННОГО COVID-19

Семенова Е.В.¹, Павлюк В.В.², Уварова М.А.³, Иванов А.В.^{2,3}

¹ ФГБУ «Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова» НИЦ «Курчатовский институт», г. Гатчина, Ленинградская обл., Россия

² ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург, Россия

³ АО «Северо-Западный центр доказательной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Изучение гуморального звена иммунного ответа на новую коронавирусную инфекцию, формирующего защитный пул специфических антител, определение выраженности и длительности такой иммунной защиты после перенесенного COVID-19 и при оценке эффективности противоковидных вакцин – важнейшие задачи современности, без решения которых невозможна победа над пандемией коронавируса SARS-CoV-2. Несмотря на огромный интерес научного сообщества к этой проблеме, результатов длительного (более полугода) анализа иммунологического статуса перенесших COVID-19 пациентов в литературе очень мало. Целью данного исследования является долгосрочный (9-14 месяцев) мониторинг развития и угасания иммунного ответа на инфекцию SARS-CoV-2 с количественной оценкой уровней IgA и IgG в крови у перенесших COVID-19 пациентов. Анализ уровней анти-SARS-CoV-2 антител в динамике продемонстрировал значительную индивидуальную вариативность и позволил разделить участников проекта по характерным чертам гуморального иммунитета после перенесенного COVID-19 три группы. В исследовании описываются характерные особенности гуморального иммунного ответа для каждой из этих групп.

Первая группа (30% добровольцев) соответствует классическим представлением о поведении антительного ответа на вирусную инфекцию. Отличительной особенностью второй группы (40% добровольцев) являются необычно высокие уровни плазменного IgA и их значительное превосходство (примерно в 2 раза) над уровнями IgG на протяжении всего периода наблюдений. Третью группу (30% добровольцев), по-видимому, составляют люди с повышенной активностью гуморального звена иммунитета на инфекцию SARS-CoV-2. Уровень плазменных антител у них сохраняется на высоких уровнях, как минимум, в течение 9-10 месяцев с начала инфекции.

Полученные данные подтверждают не вполне характерное для вирусных инфекций поведение плазменного IgA в динамике по прошествии достаточно большого отрезка времени после перенесенного заболевания у большинства участников проекта (члены 2-й и 3-й групп; 70% всех переболевших COVID-19 добровольцев) и свидетельствуют о важной роли этого иммуноглобулина в противоборстве с SARS-CoV-2. Специфические ответы анти-SARS-CoV-2 IgG очень похожи на поведение этих антител при других вирусных инфекциях, в том числе при контактах с коронавирусами предыдущих поколений.

Адрес для переписки:

Иванов Андрей Владимирович
Клиника высоких медицинских технологий имени
Н.И. Пирогова
198103, Россия, Санкт-Петербург,
наб. реки Фонтанки, 154.
Тел.: 8 (931) 360-58-52.
Факс: 8 (812) 625-25-25.
E-mail: gostyatin@gmail.com

Address for correspondence:

Ivanov Andrei V.
N. Pirogov Clinic of High Medical Technologies
198103, Russian Federation, St. Petersburg,
Fontanka emb., 154.
Phone: 7 (931) 360-58-52.
Fax: 7 (812) 625-25-25.
E-mail: gostyatin@gmail.com

Образец цитирования:

Е.В. Семенова, В.В. Павлюк, М.А. Уварова,
А.В. Иванов «Особенности гуморального иммунитета
после перенесенного COVID-19» // Медицинская
иммунология, 2022. Т. 24, № 2. С. 337-350.
doi: 10.15789/1563-0625-FOH-2452
© Семенова Е.В. и соавт., 2022

For citation:

E.V. Semenova, V.V. Pavliuk, M.A. Uvarova, A.V. Ivanov
“Features of humoral immunity after COVID-19”, *Medical
Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2022,
Vol. 24, no. 2, pp. 337-350.
doi: 10.15789/1563-0625-FOH-2452
DOI: 10.15789/1563-0625-FOH-2452

Гуморальный иммунитет против SARS-CoV-2 сохраняется более 6 месяцев, подтверждая предположение, что естественно инфицированные пациенты обладают способностью бороться с повторным заражением в течение достаточно длительного времени.

Ключевые слова: анти-SARS-CoV-2 антитела, гуморальный иммунитет, долгосрочный мониторинг, иммуноглобулин IgA, иммуноглобулин IgG, коронавирус SARS-CoV-2, COVID-19

FEATURES OF HUMORAL IMMUNITY AFTER COVID-19

Semenova E.V.^a, Pavliuk V.V.^b, Uvarova M.A.^c, Ivanov A.V.^{b, c}

^a B. Konstantinov St. Petersburg Nuclear Physics Institute, National Research Center "Kurchatov Institute", Gatchina, Leningrad Region, Russian Federation

^b St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation

^c North-West Centre for Evidence-Based Medicine JSC, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. At the present time, studying humoral immunity to the new coronavirus infection is among the most important tasks. The COVID-19 infection induces a protective pool of specific antibodies determining severity and duration of such immune protection after convalescence. The antibody testing is also necessary for assessing efficiency of anti-COVID vaccines in order to defeat the SARS-CoV-2 pandemic.

Despite enormous interest of scientific community in this problem seen in the literature, there is still a lack for longitudinal observations of immunological status (more than 6 months) in the patients who have undergone COVID-19. The aim of this study is a long-term monitoring (9-14 months) of development and extinction of immune response to SARS-CoV-2 infection using quantitative assessment of IgA and IgG levels in peripheral blood of the patients who had COVID-19 in anamnesis. Monitoring of anti-SARS-CoV-2 levels over time has demonstrated significant individual variability, and made it possible to divide the study participants into three groups, according to characteristic features of humoral immunity after documented COVID-19. The study describes characteristic features of humoral immune response for each of these groups.

The first group (30% of the study group) exhibited classical pattern of antibody response to viral infection. The second group (40% of study participants) presented with high plasma IgA levels, and their significant excess (about 2 times) over IgG levels throughout the observation period. The third group (30% of study participants), apparently comprised the subjects with increased humoral immunity to SARS-CoV-2 infection. Their plasma antibodies remain at high levels for at least 9-10 months after the onset of infection.

The data obtained confirm the pattern of plasma IgA which is not quite typical to viral infections in dynamics after a sufficiently long time period after the disease in most study participants (2nd and 3rd groups; 70% of all volunteers who have recovered from COVID-19) and suggests an important role of this immunoglobulin against SARS-CoV-2 infection. The specific responses of anti-SARS-CoV-2 IgG are very similar to behavior of such antibodies in other viral infections including contacts with coronaviruses from earlier generations.

Humoral immunity against SARS-CoV-2 may persist for more than 6 months, thus supporting an assumption that the naturally infected patients are able to resist re-infection for a long time.

Keywords: anti-SARS-CoV-2 antibody, humoral immunity, long-term monitoring, immunoglobulin IgA, immunoglobulin IgG, SARS-CoV-2, COVID-19

Введение

Беспрецедентный размах пандемии SARS-CoV-2 2020-2021 годов во всем мире обоснованно привлек к новому коронавирусу внимание всего научного сообщества. РНК-вирус SARS-CoV-2 является членом семейства бета-коронавирусов, он более контагиозен по сравнению с SARS-CoV (эпидемия 2003 года) и коронавирусом, связанным с ближневосточным респираторным синдромом MERS-CoV (эпидемия 2012 года), и вызываемое им вирусное заболевание COVID-19 обладает особенностями возникновения, течения и дальнейшего влияния на функционирова-

ние организма (так называемый постковидный синдром) [1].

Несмотря на многочисленные публикации последнего года, посвященные описанию этой коронавирусной инфекции, ряд аспектов развития COVID-19 и его последствий остается невыясненным и требующим дальнейших усилий различных исследовательских групп. Одним из важнейших направлений борьбы с вирусной пандемией является всесторонний анализ особенностей иммунного ответа организма после контакта с коронавирусом SARS-CoV-2. Изучение гуморального звена иммунологии COVID-19, формирующего защитный пул специфических анти-

тел, определение выраженности и длительности такой иммунной защиты после перенесенного COVID-19 и при оценке эффективности противокоронавирусных вакцин, эпидемиологический мониторинг и отслеживание этапов формирования популяционного иммунитета — более частные задачи, без решения которых, однако, не возможна победа над пандемией. Кроме того, сегодня нет ясного ответа на вопрос, формируется ли гуморальный иммунный ответ у людей, длительное время вынужденных существовать в окружении SARS-CoV-2-инфицированных и/или больных COVID-19.

Для большинства острых вирусных инфекций в период выздоровления и после вакцинации присутствие нейтрализующих АТ является функциональным показателем иммунитета и обеспечивает, по крайней мере, частичную устойчивость к последующим инфекциям [2, 3, 4]. Сероконверсия почти всегда возникает после подтвержденных инфекций, даже если болезнь протекает в легкой форме [5, 6, 7].

Пока неизвестно, как долго сохраняется иммунитет против SARS-CoV-2 у пациентов, выздоровевших от COVID-19. Предыдущие исследования показали, что респираторные коронавирусы, вызывающие простуду, обычно индуцируют недостаточно сильные иммунные ответы, которые быстро ослабевают [8]. Тем не менее заражение добровольцев штаммом коронавируса 229E приводило к полной устойчивости к повторному заражению и отсутствию выделения вируса в течение как минимум 1 года [9, 10]. Иммунитет против коронавирусов SARS-CoV-1 и MERS, более близких к SARS-CoV-2, также оказался сильнее [11]. Почти в 90% случаев у выздоровевших от инфекции SARS пациентов специфические и нейтрализующие IgG были обнаружены через 2 года после заражения SARS [12, 13, 14]. Однако во время более длительного наблюдения после заражения SARS (более 5 лет) IgG зафиксированы только у выздоровевших от естественной инфекции, но не у вакцинированных людей [3, 15].

В целом, сохранение более года защитного гуморального иммунитета, вызванного коронавирусами предыдущих поколений и другими острыми вирусными инфекциями, является нормой. Иммунитет к SARS-CoV-2, за некоторыми исключениями, по-видимому, будет развиваться и затухать по той же схеме [4].

Сероконверсия и выработка нейтрализующих антител, которые являются лучшим показателем защиты от инфекций и эффективности вакцин, наблюдались практически у всех пациентов с подтвержденным COVID-19 [4, 16, 17, 18, 19]. Кроме того, были опубликованы результаты использования плазмы выздоравливающих паци-

ентов для лечения тяжелых форм COVID-19 [20, 21, 22, 23]. Вирусная нагрузка у тяжелых больных была резко снижена, и состояние пациентов улучшилось вскоре после введения плазмы.

Еще одно свидетельство получено по результатам экспериментального заражения макаков. Через две недели после выздоровления от первичной инфекции макаки стали полностью устойчивыми к повторному заражению высокими дозами SARS-CoV-2 [24].

Сегодня не вызывает сомнения факт, что SARS-CoV-2 вызывает устойчивые гуморальные иммунные ответы, включая выработку вирус-специфических антител IgM, IgG и IgA. К сожалению, несмотря на то, что анализ уровней плазменных антивирусных иммуноглобулинов в динамике — очень важный аспект для оценки выраженности и длительности гуморального иммунитета после естественной инфекции и при разработке вакцин, литература о долгосрочном мониторинге защитного ответа организма практически отсутствует. При этом большинство иммунологических исследований посвящено госпитализированным тяжелым случаям COVID-19. Но динамика и продолжительность гуморальных иммунных ответов могут значительно отличаться после бессимптомных форм заболевания [18, 25, 26].

Период наблюдения для большинства исследований специфичных к SARS-CoV-2 антител составляет 12-15 недель и остается неясным, как титры антител могут измениться в последующие периоды [27]. В последнее время появилось несколько публикаций, анализирующих 6-7-месячный мониторинг гуморального иммунитета после инфицирования SARS-CoV-2 [28, 29, 30]. Однако данных на эту тему явно недостаточно, и они зачастую носят противоречивый характер. Кроме того, до сих пор неясно, какой тип антител (IgG, IgA или IgM) лучше всего подходит для эпидемиологической идентификации выздоравливающих от COVID-19 пациентов и для оценки длительности устойчивого гуморального иммунитета.

По результатам многочисленных публикаций можно сделать вывод, что сероконверсия IgM происходит примерно через 2-3 недели после начала заболевания, пик уровней IgM варьирует в диапазоне от 2 до 5 недель, но уровни IgM падают значительно раньше, чем IgG и IgA (по разным оценкам в пределах 2-3 месяцев) [17, 18, 19, 26, 30]. Кроме того, не обнаружено какой-либо четкой корреляции между ответами IgM и способностью плазмы нейтрализовать вирус в культуре клеток [18]. По-видимому, ответы IgM не формируют устойчивый иммунитет против SARS-CoV-2.

Для длительного мониторинга анти-SARS-CoV-2 гуморального иммунитета могут использоваться тесты на IgA и IgG, причем, основываясь на существующих данных о других острых респираторных инфекциях, можно ожидать более быстрого снижения IgA-ответов на SARS-CoV-2, тогда как титры IgG должны уменьшаться медленнее и оставаться на достаточно высоких уровнях в течение продолжительных периодов времени [31]. Характер вирусоспецифического ответа IgA против инфекции SARS-CoV-2 у людей остается малоизученным, но все больше исследовательских групп указывают на IgA, как на важное звено иммунного ответа против SARS-CoV-2 [16, 32, 33, 34, 35]. Кроме того, появляются новые данные, свидетельствующие о нетипичном для коронавирусных инфекций поведении анти-SARS-CoV-2 IgA у значительной части перенесших COVID-19 пациентов и у живущих в условиях пандемии коронавируса здоровых людей [37].

Поэтому мы сосредоточили свое внимание на долгосрочном мониторинге (от 9 месяцев до года) уровней специфических к SARS-CoV-2 антител IgA и IgG у людей, перенесших диагностированный с помощью РТ-ПЦР-теста COVID-19. Мы зафиксировали сохранение длительного защитного иммунитета у большинства обследованных людей в течение как минимум 6-8 месяцев после начала болезни. Анализ динамики развития и затухания иммунного ответа на инфекцию SARS-CoV-2 с количественной оценкой уровней IgA и IgG продемонстрировал значительную индивидуальную вариабельность и позволил разделить участников проекта по характерным чертам гуморального иммунитета после взаимодействия с новым коронавирусом на три группы. **Целью исследования** является описание особенностей поведения антительного ответа на SARS-CoV-2 в динамике для каждой из этих групп.

Материалы и методы

Участники проекта

В масштабном проекте по изучению особенностей гуморального иммунного ответа на инфекцию SARS-CoV-2 участвовало 180 добровольцев: 84 мужчины и 96 женщин [37].

Для данного исследования из числа участников проекта было отобрано 20 человек (10 мужчин и 10 женщин) — все, у кого в период с конца мая по декабрь 2020 г. был диагностирован COVID-19. Это относительно молодые люди, работающие в проектной организации (Санкт-Петербург, Россия) и ведущие в условиях пандемии нового коронавируса SARS-CoV-2 активный образ жизни.

Возраст участников исследования: женщины от 27 до 45 лет (средний возраст $33,85 \pm 5,98$), мужчины от 23 до 44 лет (средний возраст $35,08 \pm 5,66$).

Исследования проводились в клинике высоких медицинских технологий им. Н.И. Пирогова Санкт-Петербургского государственного университета (Санкт-Петербург, Россия). Фиксировались данные теста на коронавирус SARS-CoV-2 методом ПЦР и уровни анти-SARS-CoV-2-специфических IgA и IgG с помощью ИФА (иммуноферментный анализ). Периодичность тестирования составляла 10-14 дней. Мониторинг осуществлялся 14 месяцев: с 27 мая 2020 г. по 31 июля 2021 г.

Заявление о соблюдении этических норм и стандартов работы с человеческим биоматериалом

Авторы заявляют, что использование человеческого биологического материала (кровь и смывы со слизистых оболочек носа и горла) было одобрено Комитетом по биомедицинской этике клиники высоких медицинских технологий им. Н.И. Пирогова Санкт-Петербургского государственного университета 16.07.2020 №07/20. Все измерения проводились в соответствии с этическими принципами Хельсинкской декларации 1975 года. Все участники исследования заполнили и подписали информированное согласие на участие в этом исследовательском проекте и на публикацию результатов. Все данные обезличены.

Генетический анализ

Анализ наличия РНК вируса SARS-CoV-2 проводился из смывов со слизистых оболочек носа и зева методом ПЦР в реальном времени. Использовалась полностью автоматическая платформа Cobas 6800 и реагенты производства Roche (Швейцария). Все реакции проводились в соответствии с инструкцией изготовителя.

Иммуноферментный анализ

Иммуноферментный анализ (enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA) с использованием рекомбинантного S1-домена гликопротеина шипа SARS-CoV-2 в качестве антигена для количественного определения анти-SARS-CoV-2 IgA и IgG проводился с помощью наборов реагентов Euroimmun (Германия). Венозная кровь забиралась натощак с использованием вакуумных пробирок с активатором свертывания и гелем Lind-Vac (Эстония). Применялись автоматический микропланшетный вошер HydroFlex, ридер Infinite F50 и программное обеспечение Magelan (Tecan, Швейцария).

Euroimmun рекомендует интерпретировать результаты следующим образом: ratio менее 0,8 — отрицательно как для IgA, так и для IgG. Ratio рассчитывается по следующей формуле:

экстинкция контрольной пробы или образца пациента/экстинкция калибратора.

Результаты количественного содержания анти-SARS-CoV-2 иммуноглобулинов в плазме можно адаптировать к международному стандарту ВОЗ и представить в единицах BAU/мл (binding antibody units/ml) в соответствии с уравнением преобразования производителя «ratio * 3,2 = BAU/мл».

Статистический анализ

Статистическая обработка результатов исследования проводилась с использованием стандартных статистических функций электронных таблиц Microsoft Excel 2007 (Статистический пакет Microsoft Office 97 для Windows, Редмонд, США) и онлайн-калькулятора для расчета статистических критериев «Медицинская статистика» (<https://medstatistic.ru/calculators.html>).

Результаты

Время инфицирования SARS-CoV-2 у участников проекта

Мониторинг на наличие инфекции SARS-CoV-2 методом ПЦР и количественная оценка уровней IgG и IgA с помощью ИФА осуществлялась в течение 14 месяцев (с конца мая 2020 г. до августа 2021 г.). У трех участников проекта (2 женщины и 1 мужчина) COVID-19 диагностирован в конце мая-июне 2020 г. Т. е. продолжительность постинфекционных наблюдений для этих людей более 12 месяцев. За период наблюдения максимальное число тестирований (ПЦР + ИФА) на одного человека, заболевшего в конце мая 2020 г., составило более 50.

У остальных 17 участников проекта COVID-19 был диагностирован в октябре-декабре 2020 г. Т. е. в абсолютном большинстве случаев статус специфического к SARS-CoV-2 гуморального иммунного ответа начинал анализироваться задолго до постановки диагноза COVID-19, что позволило относительно точно зафиксировать начало заболевания. В октябре заболело 8 человек (5 мужчин и 3 женщины); в ноябре 4 человека (2 мужчин и 2 женщины); в декабре 5 человек (2 мужчины и 3 женщины). У заболевших в октябре проведено от 17 до 23 тестирований с помощью ИФА с момента постановки диагноза COVID-19, у заболевших в ноябре – 18-22 таких тестирований, у заболевших в декабре – 15-21 таких тестирований.

В наши задачи не входило выявление ассоциации иммунного ответа с клиническими показателями и тяжестью заболевания. На начальном этапе COVID-19 диагностировался при наличии положительного ПЦР теста. В дальнейшем, степень тяжести заболевания оценивалась на основании показаний участников проекта с помощью стандартных анкет. У всех 20 пациентов с COVID-19 болезнь протекала бессимптомно или в относительно легкой форме. Тяжелых или критических состояний не зафиксировано. Никто не был госпитализирован. Как правило, наблюдались симптомы легкого респираторного заболевания: недомогание, сопровождающееся незначительным повышением температуры в течение нескольких дней, головной болью, насморком и кашлем.

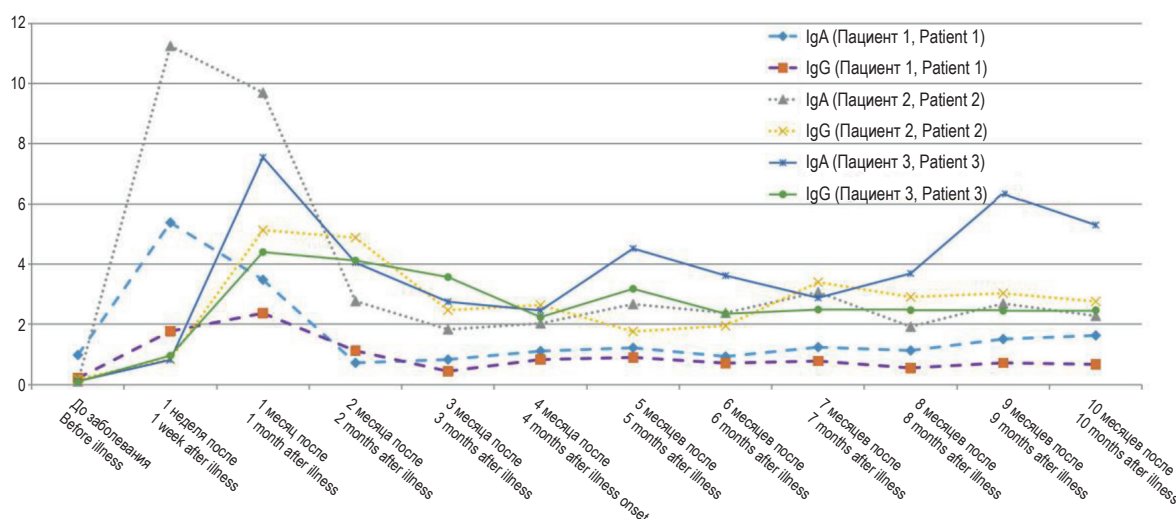


Рисунок 1. Долгосрочный мониторинг уровней анти-SARS-CoV-2 IgA и IgG в плазме крови трех участников проекта с диагностированным COVID-19

Примечание. По оси абсцисс – периодичность проведенных анализов; по оси ординат – ratio иммуноглобулинов.

Figure 1. Long-term monitoring of anti-SARS-CoV-2 IgA and IgG plasma levels of three project participants with COVID-19 diagnosed

Note. The abscissa is testing's frequency; the ordinate is the immunoglobulins ratio.

Долгосрочный мониторинг иммунологического статуса (уровни IgA и IgG) переболевших COVID-19 добровольцев

Долгосрочный мониторинг уровней IgA и IgG после инфицирования SARS-CoV-2 показал противоречивые результаты (рис. 1).

В 2 случаях из 3 по прошествии 3-4 месяцев с начала заболевания показатели уровней обоих классов антител стабилизировались вблизи определенных значений и в дальнейшем практически не менялись. Однако в 3-м случае на фоне аналогичного поведения IgG, уровни IgA после постепенного снижения в течение 3-4 месяцев до значений 2,5 демонстрировали на протяжении 8-9 месяцев повышенные значения (от 3 до 6), сопровождающиеся резкими значительными колебаниями. ПЦР-тестирования не зафиксировали в этот период инфекции вирусом SARS-CoV-2.

Описание характерных особенностей гуморального иммунитета для различных групп. Возрастные и гендерные характеристики

В целом, долгосрочный анализ уровней IgA и IgG у переболевших COVID-19 добровольцев выявил как значительную индивидуальную вариативность, так и определенные тенденции в изменении антительного ответа против SARS-CoV-2 с течением времени. По результатам исследования в зависимости от динамики развития и затухания специфического гуморального иммунного ответа на инфекцию SARS-CoV-2 все участники проекта были разделены на 3 группы.

Участники проекта распределились по этим группам примерно поровну — по 6 человек в 1-й и 3-й группах и 8 человек во 2-й группе.

1-я группа (6 человек): 4 мужчины и 2 женщины.

2-я группа (8 человек): 4 мужчины и 4 женщины.

3-я группа (5 человек): 2 мужчины и 4 женщины.

1-ю группу составили люди с характерной для вирусных инфекций динамикой гуморального иммунного ответа [38]. У вошедших в эту группу участников исследования наблюдался относительно быстрый рост уровня IgA в течение 1 месяца, затем постепенное его снижение в течение примерно 3 месяцев до нормы. Уровни IgG характеризовались более медленным ростом (~ от 1 до 2 месяцев), затем в течение 5-9 месяцев фиксировалось постепенное снижение до показателей предшествующих инфекции или до приближенных к ним значений. Уровни IgG > IgA длительный период после острой фазы COVID-19. При этом пиковые значения уровней специфических к SARS-CoV-2 антител фиксировались в 3 разных вариантах: уровни IgG > IgA, уровни IgG < IgA и уровни IgA = IgG.

Во вторую группу вошли участники проекта с отличными от классических динамическими параметрами уровней специфических к SARS-CoV-2 антител обоих типов А и G. В этой группе уровень IgA значительно превышал уровень IgG на пиковых значениях при развитии гуморального иммунного ответа. В дальнейшем в процессе его затухания уровни IgA >> IgG или уровни IgA = IgG на протяжении 5-9 месяцев после инфицирования новым коронавирусом.

К третьей группе мы отнесли людей с относительно медленным снижением уровня IgG, сопровождающимся повышенными уровнями IgA. По прошествии 5-9 месяцев с момента постановки диагноза COVID-19 уровень IgG у них оставался на высоком уровне, демонстрируя падение на 20-30% от максимальных значений.

По возрасту и гендерному составу участники проекта распределились следующим образом:

1-я группа: женщины от 27 до 45 лет (средний возраст $36,0 \pm 12,7$), мужчины от 23 до 43 лет (средний возраст $34,25 \pm 9,8$).

2-я группа: женщины от 27 до 39 лет (средний возраст $34,0 \pm 5,3$), мужчины от 27 до 37 лет (средний возраст $34,25 \pm 4,9$).

3-я группа: женщины от 29 до 31 года (средний возраст $30,0 \pm 1,0$), мужчины от 33 до 44 лет (средний возраст $38,5 \pm 7,8$).

Несмотря на то, что выборки по группам очень небольшие, не наблюдается влияния ни возраста, ни пола на вероятность попадания в ту или иную группу.

Изменение во времени при длительном мониторинге уровней анти-SARS-CoV-2 антител в каждой из 3 групп

Для лучшего понимания характера поведения специфического гуморального иммунного ответа на инфекцию SARS-CoV-2 в каждой из трех групп, мы усреднили значения уровней IgA и IgG всех членов группы с периодичностью в 1 месяц после подтвержденного с помощью ПЦР-теста COVID-19. Период наблюдения после заболевания составил 9 месяцев для каждой группы. Результаты такого анализа представлены на рисунке 2 (усредненные значения изменения уровней IgA в каждой из 3 групп) и рисунке 3 (усредненные значения изменения уровней IgG в каждой из 3 групп).

Обсуждение

Нами представлены результаты долгосрочного мониторинга (9-13 месяцев) изменения уровней плазменных анти-SARS-CoV-2 иммуноглобулинов А и G после постановки диагноза COVID-19. В абсолютном большинстве случаев систематические измерения начали проводиться задолго до начала болезни, что позволило достаточно точно

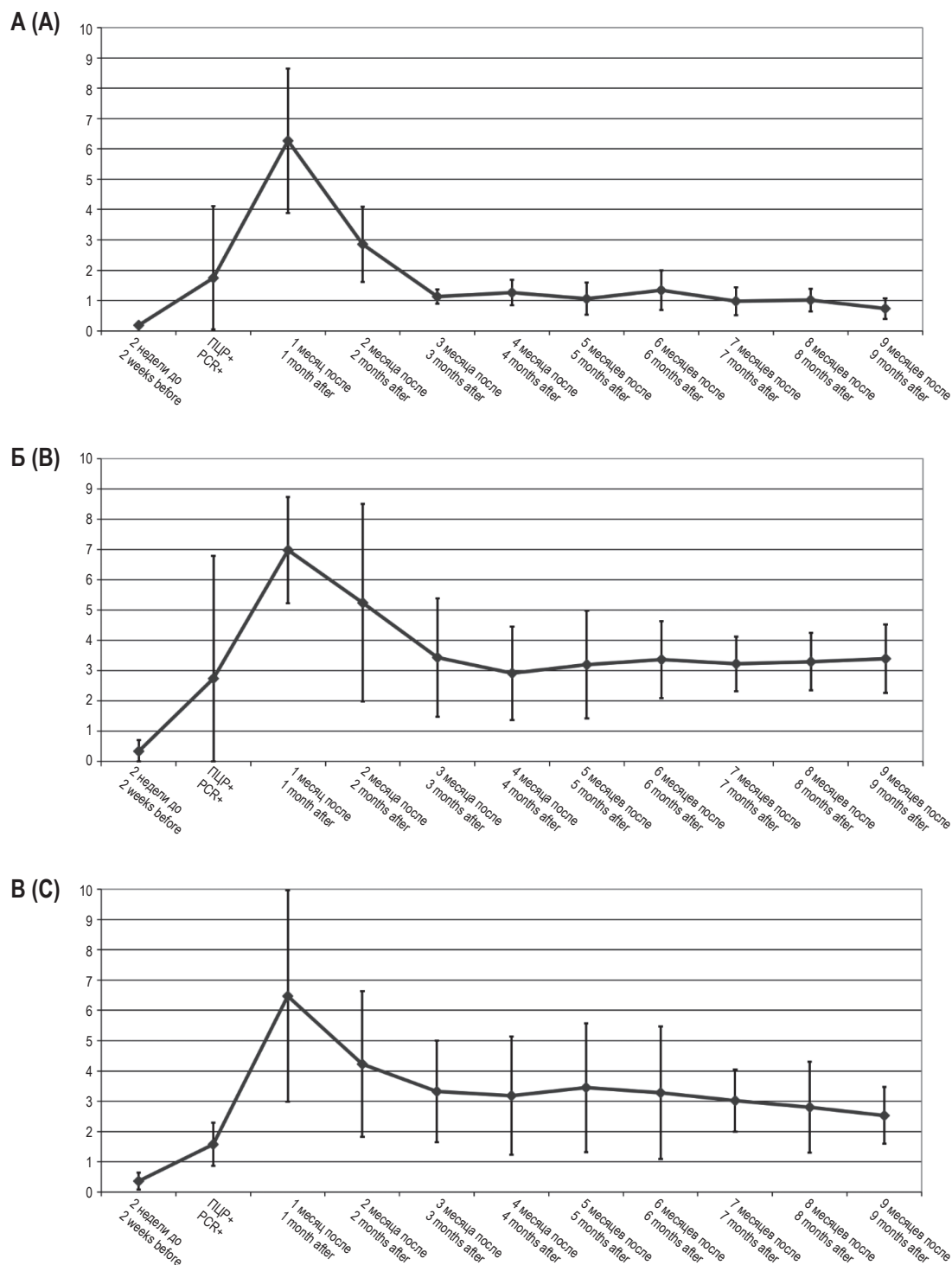


Рисунок 2. Динамика усредненных уровней анти-SARS-CoV-2 IgA на протяжении 9 месяцев наблюдения для трех групп участников проекта после постановки диагноза COVID-19

Примечание. А – усредненный уровень анти-SARS-CoV-2 IgA для 1-й группы. Б – усредненный уровень анти-SARS-CoV-2 IgA для 2-й группы. В – усредненный уровень анти-SARS-CoV-2 IgA для 3-й группы. По оси абсцисс – периодичность проведенных анализов; по оси ординат – ratio иммуноглобулинов.

Figure 2. Dynamics of anti-SARS-CoV-2 IgA average levels during 9 months of observation for three groups of project participants after the COVID-19 diagnosis

Note. A, average level of anti-SARS-CoV-2 IgA for the 1st group. B, average level of anti-SARS-CoV-2 IgA for the 2nd group. C, average level of anti-SARS-CoV-2 IgA for the 3rd group. The abscissa is testing's frequency; the ordinate is the immunoglobulins ratio.

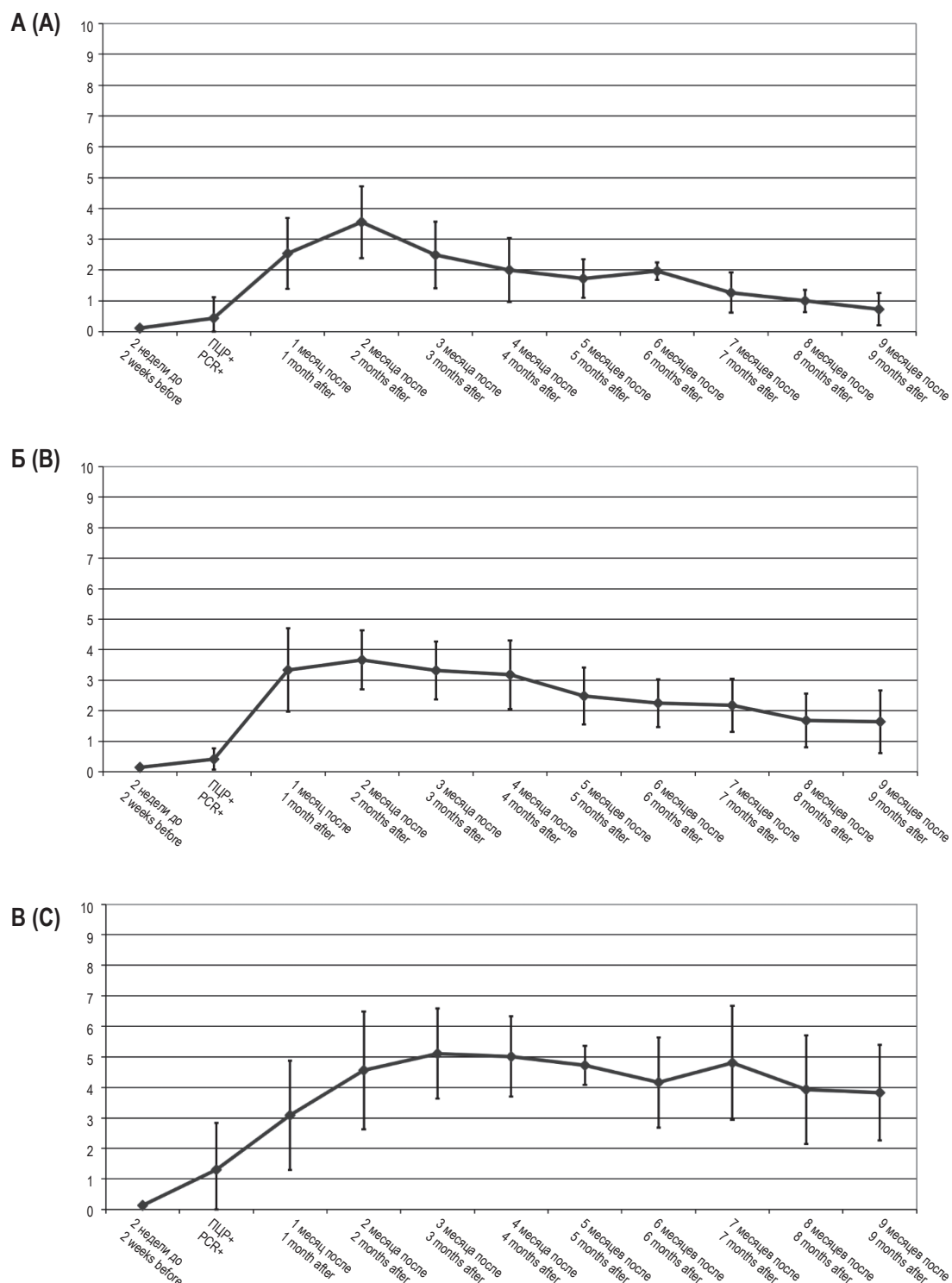


Рисунок 3. Динамика усредненных уровней анти-SARS-CoV-2 IgG на протяжении 9 месяцев наблюдения для трех групп участников проекта после постановки диагноза COVID-19

Примечание. А – усредненный уровень анти-SARS-CoV-2 IgG для 1-й группы. Б – усредненный уровень анти-SARS-CoV-2 IgG для 2-й группы. В – усредненный уровень анти-SARS-CoV-2 IgG для 3-й группы. По оси абсцисс – периодичность проведенных анализов; по оси ординат – ratio иммуноглобулинов.

Figure 3. Dynamics of anti-SARS-CoV-2 IgG average levels during 9 months of observation for three groups of project participants after the COVID-19 diagnosis

Note. A, average level of anti-SARS-CoV-2 IgG for the 1st group. B, average level of anti-SARS-CoV-2 IgG for the 2nd group. C, average level of anti-SARS-CoV-2 IgG for the 3rd group. The abscissa is testing's frequency; the ordinate is the immunoglobulins ratio.

отследить начальный момент развития гуморального иммунитета на инфекцию SARS-CoV-2. Как и в ранее опубликованных исследованиях [30, 39, 40, 41], наши данные свидетельствуют о значительной индивидуальной вариабельности анти-гуморального ответа на новый коронавирус и указывают на устойчивый гуморальный иммунитет у выздоровевших от COVID-19 пациентов, подтверждая тезис о том, что длительная защита гуморального звена иммунитета после острых вирусных инфекций является нормой [4, 8, 30].

До сих пор не достигнуто единого мнения о том, насколько демографические параметры и тяжесть COVID-19 влияют на иммунные ответы против SARS-CoV-2. Однако многие исследователи указывают на прямую корреляцию уровней анти-SARS-CoV-2 антител с тяжестью заболевания [26, 36, 42] и с более преклонным возрастом [17, 26, 43]. Нам не удалось установить значимой связи возраста с уровнями антител класса А и G, однако следует отметить, что в проекте принимали участие относительно молодые люди (самой старшей была 45-летняя женщина). Аналогичные выводы о несущественном влиянии возраста и тяжести заболевания на уровни специфических IgG сделаны и в работе [30]. Хотя эффективность антигуморальных ответов на SARS-CoV-2, по-видимому, не значительно разнятся у людей различных возрастных категорий, эту область знаний еще предстоит изучить более подробно с точки зрения авидности, широты репертуара и функциональных возможностей специфических антител.

Существуют противоречивые мнения о более сильной гуморальной иммунной реакции у инфицированных SARS-CoV-2 женщин [30, 42, 44]. Небольшое количество участников нашего проекта не позволяет сделать однозначного вывода по этой теме, однако в группе более длительного и сильного антигуморального ответа (группа 3) преобладали именно женщины.

Анализ результатов исследования позволил нам разделить участников проекта (20 человек) на 3 примерно равные по составу и численности группы, каждая из которых обладает определенными особенностями развития и затухания гуморального иммунитета.

Изменение во времени уровней IgA и IgG в каждой из трех групп происходит следующим образом.

1-я группа:

Быстрый рост до максимальных значений уровня IgA в течение месяца с момента постановки диагноза COVID-19, затем более медленный спад в течение 2 месяцев до нормальных значений (рис. 2А).

Относительно медленный рост до максимальных значений уровня IgG в течение 2 первых месяцев с момента постановки диагноза COVID-19, затем более медленный спад в течение 6 месяцев до нормальных значений (рис. 3А).

2-я группа:

Быстрый рост до максимальных значений уровня IgA в течение месяца с момента постановки диагноза COVID-19, затем более медленный спад в течение 3 месяцев примерно на 50% и сохранение этих достаточно высоких показателей в течение еще 5 месяцев (до окончания периода наблюдений) (рис. 2Б).

Довольно быстрый рост до максимальных значений уровня IgG в течение примерно первого месяца с момента постановки диагноза COVID-19, сохранение этих уровней в течение еще 2 месяцев, затем медленный спад в течение 5 месяцев до приближенных к нормальным показателям значений (рис. 3Б).

Отличительной чертой участников этой группы является значительное превышение (примерно в 2 раза) уровней IgA по сравнению с уровнями IgG в течение всего периода наблюдений.

3-я группа:

Быстрый рост до максимальных значений уровня IgA в течение месяца с момента постановки диагноза COVID-19, затем очень медленный спад в течение 4 месяцев, примерно на 30% относительно пиковых значений, и последующий период наблюдений незначительного уменьшения величины уровня IgA (рис. 2В).

Очень медленный рост до максимальных значений уровня IgG в течение примерно трех месяцев с момента постановки диагноза COVID-19, и в течение дальнейших 6 месяцев наблюдений такой же очень медленный спад примерно на 20% от пиковых значений (рис. 3В).

Полученные данные подтверждают не вполне характерное для вирусных инфекций поведение плазменного IgA в динамике по прошествии достаточно большого отрезка времени после перенесенного заболевания у большинства участников проекта (члены 2-й и 3-й групп; 70% всех переболевших COVID-19 добровольцев) и свидетельствуют о важной роли этого иммуноглобулина в противовирусном ответе на SARS-CoV-2 инфекцией [35, 37]. Максимальные значения уровней IgA достигаются примерно через месяц после начала болезни и в количественном выражении практически совпадают во всех трех группах ($\text{ratio} \geq 6,0$). Но если в первой группе уже через 2 месяца уровни IgA снижаются до нормы, то в двух других группах по прошествии 2 месяцев они выходят на плато ($\text{ratio} \sim 4,0$) и в дальнейшем сохраняют эти относительно высокие уровни (рис. 2).

Максимальные значения уровней IgG в количественном выражении в первых двух группах практически совпадают (ratio ~ 3,5), а в третьей группе примерно на 30% превосходят эти показатели (ratio ~ 5,0). Со временем эти различия только усугубляются, достигая разницы в 50-70% примерно через полгода (рис. 3).

Таким образом, первая группа (30% добровольцев) соответствует классическим представлением о поведении антительного ответа на вирусную инфекцию [38]. Отличительной особенностью второй группы (40% добровольцев) являются необычно высокие уровни плазменного IgA и их значительное превосходство (примерно в 2 раза) над уровнями IgG на протяжении всего периода наблюдений (9 месяцев). Третью группу (30% добровольцев), по-видимому, составляют люди с повышенной активностью гуморального звена иммунитета на инфекцию SARS-CoV-2. Уровень плазменных антител у них сохраняется на высоких уровнях, как минимум, в течение 9-10 месяцев с начала инфекции.

Мы не выявили существенных различий по возрастному и гендерному составу между группами. Но вполне возможно, что это следствие недостаточной выборки и в дальнейшем будут обнаружены определенные закономерности.

Подводя итог, мы можем констатировать, что полученные нами результаты согласуются с растущей массой доказательств того, что титры нейтрализующих вирусы SARS-CoV-2 иммуноглобулинов класса G остаются относительно стабильными или демонстрируют медленный распад в течение, как минимум, 6 месяцев [30, 44, 45, 46]. SARS-CoV-2-специфические ответы IgG очень похожи на ответы антител против многих других вирусов, в том числе и коронавирусов предыдущих поколений, с максимальной активностью через 6-8 недель после заражения, за которой следует фаза сокращения в течение нескольких недель с последующим длительным сохранением (более 30 недель) достигнутых уровней [8, 18, 27, 28, 29, 30, 47, 48, 49].

Представленные данные о нетипичном поведении анти-SARS-CoV-2 иммуноглобулинов класса A на протяжении длительного времени после постановки диагноза COVID-19 (9-10 месяцев) у значительной части обследованных нами людей (около 70%) — новая и интригующая информация, значительно отличающаяся от показателей для SARS-CoV во время эпидемии 2003 года [50]. Во многом наши результаты по динамике уровней IgA на начальной стадии COVID-19 совпадают с многочисленными примерами из литературы: сероконверсия IgA происходит раньше, чем сероконверсия IgG; титры IgA достигают пика на третьей-пятой неделе после инфицирования SARS-CoV-2; это более сильный (до 2 раз)

антительный ответ по сравнению с IgG [16, 27, 34, 35, 51]. Примеров длительного мониторинга уровней плазменных анти-SARS-CoV-2 IgA практически нет. Только в одном исследовании [30] сообщалось, что у 25% участников IgA обнаруживались по прошествии 30 недель после заражения.

Несмотря на явный недостаток знаний по этому вопросу, все больше ученых подчеркивают важную роль IgA при COVID-19 и указывают на необходимость мониторинга уровней IgA, специфичных для SARS-CoV-2 [16, 32, 33, 34, 35, 51].

Антитела IgA присутствуют в периферической крови и на слизистых оболочках, где вырабатываются для подавления бактериальной и вирусной адгезии и инвазии. Как правило, IgA в сыворотке представлен в форме мономера (IgA1), а в слизистой оболочке — в форме димера (иногда тримера или тетрамера) (sIgA) [52]. Циркулирующие плазмобласты предпочтительнее экспрессируют IgA1. Быстрое, но относительно краткосрочное появление плазмобластов в периферической крови — обычная черта острой фазы вирусных инфекций [53]. Возможно, сохранение в дальнейшем относительно высоких уровней циркулирующих антител IgA при COVID-19 отражает массивную инфильтрацию плазмобластов, экспрессирующих IgA, в слизистые оболочки и слюну [16]. Мономерный анти-SARS-CoV-2 IgA1 обладает большей нейтрализующей способностью по сравнению с IgG [51, 54]. По-видимому, повышенная гибкость и более протяженная шарнирная область IgA1 по сравнению с IgG [52] лучше приспособлены для взаимодействий мономера IgA с шипом SARS-CoV-2. Ранее сообщалось о подобных наблюдениях для антител, специфичных к гриппу и ВИЧ [55]. К сожалению, недостаток знаний не позволяет объяснить долгосрочное сохранение относительно высоких уровней плазменных IgA у значительной части (но не у всех) переболевших COVID-19 людей. Очевидно, необходимы дальнейшие более масштабные исследования функций вирусоспецифических анти-SARS-CoV-2 IgA и их защитной эффективности с течением времени.

Заключение

Подводя итог, это исследование показывает, что гуморальный иммунитет против SARS-CoV-2 сохраняется более 6 месяцев у большинства людей, подтверждая ранее высказанные предположения, что естественно инфицированные пациенты обладают способностью бороться с повторным заражением в течение длительного времени [4, 18, 30]. Серологические тесты необходимы для проверки чувствительности или устойчивости к повторному инфицированию.

Однако вопрос о том, в какой степени снижение титров антител после заражения SARS-CoV-2 может привести к возникновению риска повторного заражения, остается открытым и требует дальнейших исследований. При этом следует иметь в виду, что после естественных инфекций патогенами основным фактором потери иммунитета является появление вирусных серотипов и генотипов, которые обходят антителную защиту [4].

Наши результаты интересны не только с точки зрения вероятности повторного заражения. Учитывая значительную вариабельность гуморального иммунитета у участников проекта, эти индивидуальные особенности следует учитывать при схемах вакцинации.

Мы находимся только в начале пути нашего понимания долгосрочных особенностей иммун-

ной защиты при инфекции SARS-CoV-2. Необходимо комплексная оценка, нацеленная как на гуморальные, так и на клеточные измерения, включая анализ сыворотки, слюны и слизистых оболочек, а также циркулирующие и тканевые Т- и В-клетки памяти.

Благодарности

Авторы выражают благодарность лаборантам отдела клинической лабораторной диагностики АО «СЗЦДМ» Елене Максимовой и Никите Золотаренко за помощь в выполнении тестов ИФА, Елене Ковалевой, Павлу Марчуку, Юлии Козуб и Софии Серко за помощь в выполнении тестов ПЦР.

Список литературы / References

1. Amanat F., Stadlbauer D., Strohmeier S., Nguyen T.H.O., Chromikova V., McMahon M., Jiang K., Arunkumar G.A., Jürchyszak D., Polanco J., Bermudez-Gonzalez M., Kleiner G., Aydıllı T., Miorin L., Fierer D.S., Lugo L.A., Kojic E.M., Stoeve J., Liu S.T.H., Cunningham-Rundles C., Felgner P.L., Moran T., García-Sastre A., Caplivski D., Cheng A.C., Kedzierska K., Vapalahti O., Hepojoki J.M., Simon V., Krammer F. A serological assay to detect SARS-CoV-2 seroconversion in humans. *Nat. Med.*, 2020, Vol. 26, no. 7, pp. 1033-1036.
2. Azkur A.K., Akdis M., Azkur D., Sokolowska M., van de Veen W., Brügggen M.-C., O'Mahony L., Gao Y., Nadeau K., Akdis C.A. Immune response to SARS-CoV-2 and mechanisms of immunopathological changes in COVID-19. *Allergy*, 2020, Vol. 75, no. 7, pp. 1564-1581.
3. Baumgarth N., Nikolich-Zugich J., Lee F.E.-H., Bhattacharya D. Antibody responses to SARS-CoV-2: let's stick to known knowns. *J. Immunol.*, 2020, Vol. 205, no. 9, pp. 2342-2350.
4. Bene M.C., de Carvalho M., Eveillard M., Lebri Y. Good IgA bad IgG in SARS-CoV-2 infection? *Clin. Infect. Dis.*, 2020, Vol. 71, no. 15, pp. 897-898.
5. Borremans B., Gamble A., Prager K.C., Helman S.K., McClain A.M., Cox C., Savage V., Lloyd-Smith J.O. Quantifying antibody kinetics and RNA detection during early-phase SARS-CoV-2 infection by time since symptom onset. *eLife*, 2020, Vol. 9, e60122. doi: 10.7554/eLife.60122.
6. Callow K.A., Parry H.F., Sergeant M., Tyrrell D.A. The time course of the immune response to experimental coronavirus infection of man. *Epidemiol. Infect.*, 1990, Vol. 105, no. 2, pp. 435-446.
7. Cao W.C., Liu W., Zhang P.H., Zhang F., Richardus J.H. Disappearance of antibodies to SARS-associated coronavirus after recovery. *N. Engl. J. Med.*, 2007, Vol. 357, no. 11, pp. 1162-1163.
8. Carnicelli A., Fiori B., Ricci R., Piano A., Bonadia N., Taddei E., Fantoni M., Murri R., Cingolani A., Barillaro C., Cutuli S.L., Marchesini D., Della Polla D.A., Forte E., Fuorlo M., Di Maurizio L., Amorini P., Cattani P., Franceschi F., Sanguinetti M. Characteristic of IgA and IgG antibody response to SARS-CoV-2 infection in an Italian referral COVID-19 Hospital. *Intern. Emerg. Med.*, 2021, Vol. 10, pp. 1-12.
9. Carrillo J., Izquierdo-Useros N., Avila-Nieto C., Pradenas E., Clotet B., Blanco J. Humoral immune responses and neutralizing antibodies against SARS-CoV-2; implications in pathogenesis and protective immunity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2021, Vol. 538, pp. 187-191.
10. Chandrashekar A., Liu J., Martinot A.J., McMahan K., Mercado N.B., Peter L., Tostanoski L.H., Yu J., Maliga Z., Nekorchuk M., Busman-Sahay K., Terry M., Wrijil L.M., Ducat S., Martinez D.R., Atyeo C., Fischinger S., Burke J.S., Slein M.D., Pessaint L., Van Ry A., Greenhouse J., Taylor T., Blade K., Cook A., Finneyfrock B., Brown R., Teow E., Velasco J., Zahn R., Wegmann F., Abbink P., Bondzie E.A., Dagotto G., Gebre M.S., He X., Jacob-Dolan C., Kordana N., Li Z., Lifton M.A., Mahrokhian S.H., Maxfield L.F., Nityanandam R., Nkolola J.P., Schmidt A.G., Miller A.D., Baric R.S., Alter G., Sorger P.K., Estes J.D., Andersen H., Lewis M.G., Barouch D.H. SARSCoV-2 infection protects against rechallenge in rhesus macaques. *Science*, 2020, Vol. 369, no. 6505, pp. 812-817.
11. Chen S.Y., Lee Y.L., Lin Y.C., Lee N.Y., Liao C.H., Hung Y.P., Lu M.-C., Wu J.-L., Tseng W.-P., Lin C.H., Chung M.-Y., Kang C.-M., Lee Y.-F., Lee T.-F., Cheng C.-Y., Chen C.-P., Huang C.-H., Liu C.-E., Cheng S.-H., Ko W.C., Hsueh P.-R., Chen S.-C. Multicenter evaluation of two chemiluminescence and three lateral flow immunoassays for the diagnosis of COVID-19 and assessment of antibody dynamic responses to SARS-CoV-2 in Taiwan. *Emerg. Microbes Infect.*, 2020, Vol. 9, no. 1, pp. 2157-2168.
12. Choe P.G., Kim K.-H., Kang C.K., Suh H.J., Kang E.K., Lee S.Y., Kim N.J., Yi J., Park W.B., Oh M.-D. Antibody responses 8 months after asymptomatic or mild SARS-CoV-2 infection. *Emerg. Infect. Dis.*, 2021, Vol. 27, no. 3, pp. 928-931.

13. Crawford K.H.D., Dingens A.S., Eguia R., Wolf C.R., Wilcox N., Logue J.K., Shuey K., Casto A.M., Fiala B., Wrenn S., Pettie D., King N.P., Greninger A.L., Chu H.Y., Bloom J.D. Dynamics of neutralizing antibody titers in the months after severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 infection. *J. Infect. Dis.*, 2021, Vol. 223, no. 2, pp. 197-205.
14. Duan K., Liu B., Li C., Zhang H., Yu T., Qu J., Zhou M., Chen L., Meng S., Hu Y., Peng C., Yuan M., Huang J., Wang Z., Yu J., Gao X., Wang D., Yu X., Li L., Zhang J., Wu X., Li B., Xu Y., Chen W., Peng Y., Hu Y., Lin L., Liu X., Huang S., Zhou Z., Zhang L., Wang Y., Zhang Z., Deng K., Xia Z., Gong Q., Zhang W., Zheng X., Liu Y., Yang H., Zhou D., Yu D., Hou J., Shi Z., Chen S., Chen Z., Zhang X., Yang X. Effectiveness of convalescent plasma therapy in severe COVID19 patients. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 2020, Vol. 117, no. 17, pp. 9490-9496.
15. Edridge A.W.D., Kaczorowska J., Hoste A.C.R., Bakker M., Klein M., Loens K., Jebbink M.F., Matser A., Kinsella C.M., Rueda P., Ieven M., Goossens H., Prins M., Sastre P., Deijns M., van der Hoek L. Seasonal coronavirus protective immunity is short-lasting. *Nat. Med.*, 2020, Vol. 26, no. 11, pp. 1691-1693.
16. Ejemel M., Li Q., Hou S., Schiller Z.A., Tree J.A., Wallace A., Amcheslavsky A., Kurt Yilmaz N., Buttigieg K.R., Elmore M.J., Godwin K., Coombes N., Toomey J.R., Schneider R., Ramchetty A.S., Close B.J., Chen D.-Y., Conway H.L., Saeed M., Ganesa C., Carroll M.W., Cavacini L.A., Klempner M.S., Schiffer C.A., Wang Y. A cross-reactive human IgA monoclonal antibody blocks SARS-CoV-2 spike-ACE2 interaction. *Nat. Commun.*, 2020, Vol. 11, no. 1, 4198. doi: 10.1038/s41467-020-18058-8.
17. Fink K. Origin and function of circulating plasmablasts during acute viral infections. *Front. Immunol.*, 2012, Vol. 3, 78. doi: 10.3389/fimmu.2012.00078.
18. Glück V., Grobecker S., Tydykov L., Salzberger B., Glück T., Weidlich T., Bertok M., Gottwald C., Wenzel J.J., Gessner A., Schmidt B., Peterhoff D. SARS-CoV-2-directed antibodies persist for more than six months in a cohort with mild to moderate COVID-19. *Infection*, 2021, Vol. 49, no. 4, pp. 739-746.
19. Gorse G.J., Donovan M.M., Patel G.B. Antibodies to coronaviruses are higher in older compared with younger adults and binding antibodies are more sensitive than neutralizing antibodies in identifying coronavirus-associated illnesses. *J. Med. Virol.*, 2020, Vol. 92, no. 5, pp. 512-517.
20. Grifoni A., Weiskopf D., Ramirez S.I., Mateus J., Dan J.M., Moderbacher C.R., Rawlings S.A., Sutherland A., Premkumar L., Jadi R.S., Marrama D., de Silva A.M., Frazier A., Carlin A.F., Greenbaum J.A., Peters B., Krammer F., Smith D.M., Crotty S., Sette A. Targets of T cell responses to SARS-CoV-2 coronavirus in humans with COVID-19 disease and unexposed individuals. *Cell*, 2020, Vol. 181, no. 7, pp. 1489-1501.e15.
21. Gudbjartsson D.F., Norddahl G.L., Melsted P., Gunnarsdottir K., Holm H., Eythorsson E., Arnthorsson A.O., Helgason D., Bjarnadottir K., Ingvarsson R.F., Thorsteinsdottir B., Kristjansdottir S., Birgisdottir K., Kristinsdottir A.M., Sigurdsson M.I., Arnadottir G.A., Ivarsdottir E.V., Andresdottir M., Jonsson F., Agustsdottir A.B., Berglund J., Eiriksdottir B., Fridriksdottir R., Gardarsdottir E.E., Gottfredsson M., Gretarsdottir O.S., Gudmundsdottir S., Gudmundsson K.R., Gunnarsdottir T.R., Gylfason A., Helgason A., Jensson B.O., Jonasdottir A., Jonsson H., Kristjansson T., Kristinsson K.G., Magnusdottir D.N., Magnusson O.T., Olafsdottir L.B., Rognvaldsson S., le Roux L., Sigmundsdottir G., Sigurdsson A., Sveinbjornsson G., Sveinsdottir K.E., Sveinsdottir M., Thorarensen E.A., Thorbjornsson B., Thordardottir M., Saemundsdottir J., Kristjansson S.H., Josefsdottir K.S., Masson G., Georgsson G., Kristjansson M., Moller A., Palsson R., Gudnason T., Thorsteinsdottir U., Jonsdottir I., Sulem P., Stefansson K. Humoral immune response to SARS-CoV-2 in Iceland. *N. Engl. J. Med.*, 2020, Vol. 383, no. 18, pp. 1724-1734.
22. Guo L., Ren L., Yang S., Xiao M., Chang D., Yang F., Dela Cruz C.S., Wang Y., Wu C., Xiao Y., Zhang L., Han L., Dang S., Xu Y., Yang Q.W., Xu S.-Y., Zhu H.-D., Xu Y.-C., Jin Q., Sharma L., Wang L., Wang J. Profiling early humoral response to diagnose novel coronavirus disease (COVID-19). *Clin. Infect. Dis.*, 2020, Vol. 71, no. 15, pp. 778-785.
23. Hsueh P.R., Huang L.M., Chen P.J., Kao C.L., Yang P.C. Chronological evolution of IgM, IgA, IgG and neutralisation antibodies after infection with SARS-associated coronavirus. *Clin. Microbiol. Infect.*, 2004, Vol. 10, no. 12, pp. 1062-1066.
24. Huang Z., Chen H., Xue M., Huang H., Zheng P., Luo W., Liang X., Sun B., Zhong N. Characteristics and roles of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2-specific antibodies in patients with different severities of coronavirus 19. *Clin. Exp. Immunol.*, 2020, Vol. 202, no. 2, pp. 210-219.
25. Infantino M., Manfredi M., Grossi V., Lari B., Fabbri S., Benucci M., Fortini A., Damiani A., Mobilia E.M., Panciroli M., Pancani S., Pesce G. Closing the serological gap in the diagnostic testing for COVID-19: the value of anti-SARS-CoV-2 IgA antibodies. *J. Med. Virol.*, 2021, Vol. 93, no. 3, pp. 1436-1442.
26. 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., Budykowski 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.
27. Ivanov A., Semenova E. Long-term monitoring of the development and extinction of IgA and IgG responses to SARS-CoV-2 infection. *J. Med. Virol.*, 2021, Vol. 93, no. 10, pp. 5953-5960.
28. Li K., Huang B., Wu M., Zhong A., Li L., Cai Y., Wang Z., Wu L., Zhu M., Li J., Wang Z., Wu W., Li W., Bosco B., Gan Z., Qiao Q., Wu J., Wang Q., Wang S., Xia X. Dynamic changes in anti-SARS-CoV-2 antibodies during

SARS-CoV-2 infection and recovery from COVID-19. *Nat. Commun.*, 2020, Vol. 11, no. 1, 6044. doi: 10.1038/s41467-020-19943-y.

29. Li L., Zhang W., Hu Y., Tong X., Zheng S., Yang J., Kong Y., Ren L., Wei Q., Mei H., Hu C., Tao C., Yang R., Wang J., Yu Y., Guo Y., Wu X., Xu Z., Zeng L., Xiong N., Chen L., Wang J., Man N., Liu Y., Xu H., Deng E., Zhang X., Li C., Wang C., Su S., Zhang L., Wang J., Wu Y., Liu Z. Effect of convalescent plasma therapy on time to clinical improvement in patients with severe and life-threatening COVID-19: a randomized clinical trial. *JAMA*, 2020, Vol. 324, no. 5, pp. 1-11.

30. Li Z., Yi Y., Luo X., Xiong N., Liu Y., Li S., Sun R., Wang Y., Hu B., Chen W., Zhang Y., Wang J., Huang B., Lin Y., Yang J., Cai W., Wang X., Cheng J., Chen Z., Sun K., Pan W., Zhan Z., Chen L., Ye F. Development and clinical application of a rapid IgM-IgG combined antibody test for SARS-CoV-2 infection diagnosis. *J. Med. Virol.*, 2020, Vol. 92, no. 9, pp. 1518-1524.

31. Lin D., Liu L., Zhang M., Hu Y., Yang Q., Guo J., Dai Y., Xu Y., Cai Y., Chen X., Huang K., Zhang Z. Evaluations of the serological test in the diagnosis of 2019 novel coronavirus (SARS-CoV-2) infections during the COVID-19 outbreak. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 2020, Vol. 39, no. 12, pp. 2271-2277.

32. Liu S.T.H., Lin H.-M., Baine I., Wajnberg A., Gumprecht J.P., Rahman F., Rahman F., Rodriguez D., Tandon P., Bassily-Marcus A., Bander J., Sanky C., Duppre A., Zheng A., Nguyen F.T., Amanat F., Stadlbauer D., Altman D.R., Chen B.K., Mendu D.R., Firpo-Betancourt A., Levin M.A., Bagiella E., Casadevall A., Cordon-Cardo C., Jhang J.S., Arinsburg S.A., Reich D.L., Aberg J.A., Bouvier N.M. Convalescent plasma treatment of severe COVID-19: a propensity score-matched control study. *Nat. Med.*, 2020, Vol. 26, no. 11, pp. 1708-1713.

33. Liu W., Liu L., Kou G., Zheng Y., Ding Y., Ni W., Wang Q., Tan L., Wu W., Tang S., Xiong Z., Zheng S. Evaluation of nucleocapsid and spike protein-based enzyme-linked immunosorbent assays for detecting antibodies against SARS-CoV-2. *J. Clin. Microbiol.*, 2020, Vol. 58, no. 6, pp. e00461-e00420.

34. Long Q.-X., Liu B.-Z., Deng H.-J., Wu G.-C., Deng K., Chen Y.-K., Liao P., Qiu J.F., Lin Y., Cai X.-F., Wang D.Q., Hu Y., Ren J.-H., Tang N., Xu Y.-Y., Yu L.-H., Mo Z., Gong F., Zhang X.-L., Tian W.-G., Hu L., Zhang X. X., Xiang J.-L., Du H.-X., Liu H.-W., Lang C.-H., Luo X.-H., Wu S.-B., Cui X.-P., Zhou Z., Zhu M.-M., Wang J., Xue C. J., Li X.-F., Wang L., Li Z.-J., Wang K., Niu C.-C., Yang Q.-J., Tang X.-J., Zhang Y., Liu X.-M., Zhang D.-C., Zhang F., Liu P., Yuan J., Li Q., Hu J.-L., Chen J., Huang A.-L. Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients with COVID-19. *Nat. Med.*, 2020, Vol. 26, no. 6, pp. 845-848.

35. Mai H.K., Trieu N.B., Long T.H., Thanh H.T., Luong N.D., Huy L.X., Nguyet L.A., Man D.N.H., Anderson D.E., Thanh T.T., Chau N.V.V., Thwaites G., Wang L.-F., Tan L.V., Hung D.T. Long-term humoral immune response in persons with asymptomatic or mild SARS-CoV-2 infection, Vietnam. *Emerg. Infect. Dis.*, 2021, Vol. 27, no. 2, pp. 663-666.

36. Moderbacher C.R., Ramirez S.I., Dan J.M., Grifoni A., Hastie K.M., Weiskopf D., Belanger S., Abbott R.K., Kim C., Choi J., Kato Y., Crotty E.G., Kim C., Rawlings S.A., Mateus J., Tse L.P.V., Frazier A., Baric R., Peters B., Greenbaum J., Ollmann Saphire E., Smith D.M., Sette A., Crotty S. Antigen-specific adaptive immunity to SARS-CoV-2 in acute COVID-19 and associations with age and disease severity. *Cell*, 2020, Vol. 183, no. 4, pp. 996-1012.

37. Muramatsu M., Yoshida R., Yokoyama A., Miyamoto H., Kajihara M., Maruyama J., Nao N., Manzoor R., Takada A. Comparison of antiviral activity between IgA and IgG specific to influenza virus hemagglutinin: Increased potential of IgA for heterosubtypic immunity. *PLoS One*, 2014, Vol. 9, no. 1, e85582. doi: 10.1371/journal.pone.0085582.

38. Murchu E.O., Byrne P., Walsh K.A., Carty P.G., Connolly M., de Gascun C., Jordan K., Keogh M., O'Brien K.K., O'Neill M., Smith S.M., Teljeur C., Ryan M., Harrington P. Immune response following infection with SARS-CoV-2 and other coronaviruses: A rapid review. *Rev. Med. Virol.*, 2021, Vol. 31, no. 2, e2162. doi: 10.1002/rmv.2162

39. Ni L., Ye F., Cheng M.L., Feng Y., Deng Y.Q., Zhao H., Wei P., Ge J., Gou M., Li X., Sun L., Cao T., Wang P., Zhou C., Zhang R., Liang P., Guo H., Wang X., Qin C.-F., Chen F., Dong C. Detection of SARS-CoV-2-specific humoral and cellular immunity in COVID-19 convalescent individuals. *Immunity*, 2020, Vol. 52, no. 6, pp. 971-977.e3.

40. Padoan A., Sciacovelli L., Basso D., Negrini D., Zuin S., Cosma C., Faggian D., Matricardi P., Plebani M. IgA-Ab response to spike glycoprotein of SARS-CoV-2 in patients with COVID-19: a longitudinal study. *Clin. Chim. Acta*, 2020, Vol. 507, pp. 164-166.

41. Premkumar L., Segovia-Chumbez B., Jadi R., Martinez D.R., Raut R., Markmann A.J., Cornaby C., Bartelt L., Weiss S., Park Y., Edwards C.E., Weimer E., Scherer E.M., Rouphael N., Edupuganti S., Weiskopf D., Tse L.V., Hou Y.J., Margolis D., Sette A., Collins M.H., Schmitz J., Baric R.S., de Silva A.M. The receptor binding domain of the viral spike protein is an immunodominant and highly specific target of antibodies in SARS-CoV-2 patients. *Sci. Immunol.*, 2020, Vol. 5, no. 48, eabc8413. doi: 10.1126/sciimmunol.abc8413.

42. Reed S.E. The behaviour of recent isolates of human respiratory coronavirus in vitro and in volunteers: evidence of heterogeneity among 229E-related strains. *J. Med. Virol.*, 1984, Vol. 13, no. 2, pp. 179-192.

43. Schroeder H.W., Cavacini L. Structure and function of Immunoglobulins. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2010, Vol. 125, no. 202, pp. 41-52.

44. Seow J., Graham C., Merrick B., Acors S., Pickering S., Steel K.J.A., Hemmings O., O'Byrne A., Kouphou N., Galao R.P., Betancor G., Wilson H.D., Signell A.W., Winstone H., Kerridge C., Huettner L., Jimenez-Guardeno J.M., Lista M.J., Temperton N., Snell L.B., Bisnauthsing K., Moore A., Green A., Martinez L., Stokes B., Honey J., Izquierdo-

Barras A., Arbane G., Patel A., Tan M.K.I., O'Connell L., O'Hara G., MacMahon E., Douthwaite S., Nebbia G., Batra R., Martinez-Nunez R., Shankar-Hari M., Edgeworth J.D., Neil S.J.D., Malim M.H., Doores K.J. Longitudinal observation and decline of neutralizing antibody responses in the three months following SARS-CoV-2 infection in humans. *Nat. Microbiol.*, 2020, Vol. 5, no. 12, pp. 1598-1607.

45. Shen C., Wang Z., Zhao F., Yang Y., Li J., Yuan J., Wang F., Li D., Yang M., Xing L., Wei J., Xiao H., Yang Y., Qu J., Qing L., Chen L., Xu Z., Peng L., Li Y., Zheng H., Chen F., Huang K., Jiang Y., Liu D., Zhang Z., Liu Y., Liu L. Treatment of 5 critically ill patients with COVID-19 with convalescent plasma. *JAMA*, 2020, Vol. 323, no. 16, pp. 1582-1589.

46. 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.

47. Sun B., Feng Y., Mo X., Zheng P., Wang Q., Li P., Peng P., Liu X., Chen Z., Huang H., Zhang F., Luo W., Niu X., Hu P., Wang L., Peng H., Huang Z., Feng L., Li F., Zhang F., Li F., Zhong N., Chen L. Kinetics of SARS-CoV-2 specific IgM and IgG responses in COVID-19 patients. *Emerg. Microbes Infect.*, 2020, Vol. 9, no. 1, pp. 940-948.

48. Sterlin D., Mathian A., Miyara M., Mohr A., Anna F., Claër L., Quentric P., Fadlallah J., Devilliers H., Ghillani P., Gunn C., Hockett R., Mudumba S., Guihot A., Luyt C.-E., Mayaux J., Beurton A., Fourati S., Bruel T., Schwartz O., Lacorte J.-M., Yssel H., Parizot C., Dorgham K., Charneau P., Amoura Z., Gorochov G. IgA dominates the early neutralizing antibody response to SARS-CoV-2. *Sci. Transl. Med.*, 2021, Vol. 13, no. 577, eabd2223. doi: 10.1126/scitranslmed.abd2223.

49. Tang F., Quan Y., Xin Z.-T., Wrammert J., Ma M.-J., Lv H., Wang T.-B., Yang H., Richardus J.H., Liu W., Cao W.-C. Lack of peripheral memory B cell responses in recovered patients with severe acute respiratory syndrome: a six-year follow-up study. *J. Immunol.*, 2011, Vol. 186, no. 12, pp. 7264-7268.

50. Wajnberg A., Amanat F., Firpo A., Altman D.R., Bailey M.J., Mansour M., McMahon M., Meade P., Mendu D.R., Muellers K., Stadlbauer D., Stone K., Strohmeier S., Simon V., Aberg J., Reich D.L., Krammer F., Cordon-Cardo C. Robust neutralizing antibodies to SARS-CoV-2 infection persist for months. *Science*, 2020, Vol. 370, no. 6521, pp. 1227-1230.

51. Woo P.C.Y., Lau S.K.P., Wong B.H.L., Tsoi H.-W., Fung A.M.Y., Chan K.-H., Tam V.K.P., Malik Peiris J.S., Yuen K.-Y. Detection of specific antibodies to severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus nucleocapsid protein for serodiagnosis of SARS coronavirus pneumonia. *J. Clin. Microbiol.*, 2004, Vol. 42, no. 5, pp. 2306-2309.

52. Wu J., Liang B., Chen C., Wang H., Fang Y., Shen S., Yang X., Wang B., Chen L., Chen Q., Wu Y., Liu J., Yang X., Li W., Zhu B., Zhou W., Wang H., Li S., Lu S., Liu D., Li H., Krawczyk A., Lu M., Yang D., Deng F., Dittmer U., Trilling M., Zheng X. SARS-CoV-2 infection induces sustained humoral immune responses in convalescent patients following symptomatic COVID-19. *Nat. Commun.*, 2021, Vol. 12, no. 1, 1813. doi: 10.1038/s41467-021-22034-1.

53. Zhao J., Yuan Q., Wang H. Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients of novel coronavirus disease 2019. *Clin. Infect. Dis.*, 2020, Vol. 71, no. 16, pp. 2027-2034.

54. Zhou P., Yang X.L., Wang X.G., Hu B., Zhang L., Zhang W., Si H.-R., Zhu Y., Li B., Huang C.-L., Chen H.-D., Chen J., Luo Y., Guo H., Jiang R.-D., Liu M.-Q., Chen Y., Shen X.-R., Wang X., Zheng X.-S., Zhao K., Chen Q.-J., Deng F., Liu L.-L., Yan B., Zhan F.-X., Wang Y.-Y., Xiao G.-F., Shi Z.-L. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*, 2020, Vol. 579, no. 7798, pp. 270-273.

55. Zinkernagel R.M., Hengartner H. Protective 'immunity' by pre-existent neutralizing antibody titers and preactivated T cells but not by so-called 'immunological memory'. *Immunol. Rev.*, 2006, Vol. 211, pp. 310-319.

Авторы:

Семенова Е.В. — к.б.н., научный сотрудник
отделения молекулярной и радиационной биофизики
ФГБУ «Петербургский институт ядерной физики
им. Б.П. Константинова» НИЦ «Курчатовский
институт», г. Гатчина, Ленинградская обл., Россия

Павлюк В.В. — студент 5 курса (магистратура курса
кафедры цитологии и гистологии) биологического
факультета ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский
государственный университет», Санкт-Петербург,
Россия

Уварова М.А. — биолог отдела клинической
лабораторной диагностики АО «Северо-Западный
центр доказательной медицины», Санкт-Петербург,
Россия

Иванов А.В. — к.б.н., биолог клиники высоких
медицинских технологий имени Н.И. Пирогова
ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный
университет»; руководитель группы генетических
исследований АО «Северо-Западный центр
доказательной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Authors:

Semenova E.V., PhD (Biology), Research Associate, Division
of Molecular and Radiation Biophysics, B. Konstantinov
St. Petersburg Nuclear Physics Institute, National Research
Center "Kurchatov Institute", Gatchina, Leningrad Region,
Russian Federation

Pavliuk V.V., Student, Department of Cytology and Histology,
St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian
Federation

Uvarova M.A., Biologist, Department of Clinical Laboratory
Diagnostics, North-West Centre for Evidence-Based Medicine
JSC, St. Petersburg, Russian Federation

Ivanov A.V., PhD (Biology), Biologist, N. Pirogov Clinic
of High Medical Technologies, St. Petersburg State University;
Head, Department of Genetics, North-West Centre for
Evidence-Based Medicine JSC, St. Petersburg, Russian
Federation

Поступила 28.11.2021
Принята к печати 04.01.2022

Received 28.11.2021
Accepted 04.01.2022

ПРОФИЛЬ АНТИФОСФОЛИПИДНЫХ АНТИТЕЛ И СОСТОЯНИЕ СИСТЕМЫ КОМПЛЕМЕНТА У БОЛЬНЫХ COVID-19 РАЗНОЙ СТЕПЕНИ ТЯЖЕСТИ

Долгушина Н.В., Менжинская И.В., Безнощенко О.С.,
Муллабаева С.М., Городнова Е.А., Кречетова Л.В.

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии
имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Резюме. COVID-19 — тяжелый острый респираторный синдром, вызванный SARS-CoV-2, может предрасполагать к тромботическим событиям, особенно при сочетании с антифосфолипидными антителами (аФЛ). Однако имеются ограниченные данные о распространенности и антигенной специфичности аФЛ при COVID-19. Предполагается, что активация комплемента играет важную роль в патогенезе COVID-19-ассоциированной коагулопатии. В условиях пандемии SARS-CoV-2 необходимо выявить значимые биомаркеры для прогнозирования тяжелого течения COVID-19 и риска тромботических осложнений. Цель — оценить профиль аФЛ, количественное содержание компонентов и активность комплемента у больных с COVID-19 разной степени тяжести в динамике.

С помощью ИФА в сыворотке крови определяли антитела (М, G) к кардиолипину (КЛ), фосфатидилсерину (ФС), β 2-гликопротеину-I (β 2-ГП-I), протромбину (ПТ), аннексину V (Ан V), компоненту комплемента C1q, содержание компонентов комплемента C3 и C4, общую активность комплемента. В исследование включили 141 больного COVID-19, группу 1 составили 39 пациентов с легкой формой, группу 2 — 65 пациентов со среднетяжелой формой, группу 3 — 37 пациентов с тяжелой формой COVID-19. Образцы крови были получены на 3-7-й день заболевания (1-я точка) и через 14-28 дней (2-я точка).

аФЛ были обнаружены суммарно у 29,1% больных COVID-19, частота выявления аФЛ в группах не различалась (35,9%, 23,1% и 32,4%; $p > 0,05$). У 8,5% больных аФЛ обнаруживались только в 1-й точке, у 14,2% — только во 2-й точке, у 6,4% — в двух точках измерения. Более часто выявлялись антитела к ПТ (15,6%) и Ан V (11,3%). Частота выявления антител к ПТ была значимо выше, чем антител к КЛ и ФС (7,1%), β 2-ГП-I (7,8%). Распространенность аФЛ в группах 1 и 3 не различалась. В 1-ой точке в группе 3 повышение уровня C4 (89,2%) и C3 (24,3%) в крови и снижение активности комплемента (35,1%) наблюдалось чаще, чем в группе 1. Во 2-й точке в группе 3 часто выявлялось снижение активности комплемента (59,5%). Установлено, что при уровне C3 > 720 мкг/мл риск развития тяжелой формы COVID-19 повышается в 2,6 раза, а при уровне C4 > 740 мкг/мл — в 3,3 раза.

У больных COVID-19 при низкой распространенности антител к КЛ и β 2-ГП-I часто обнаруживаются антитела к ПТ и Ан V. Эти антитела могут вовлекаться в патогенез COVID-19-ассоциированной

Адрес для переписки:

Менжинская Ирина Владимировна
ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский
центр акушерства, гинекологии и перинатологии
имени академика В.И. Кулакова» Министерства
здравоохранения РФ
117997, Россия, Москва, ул. Акад. Опарина, 4.
Тел.: 8 (495) 438-11-83.
Факс: 8 (495) 438-49-65.
E-mail: i_menzinskaya@oparina4.ru

Address for correspondence:

Menzhinskaya Irina V.
V. Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics,
Gynecology and Perinatology
117997, Russian Federation, Moscow, Acad. Oparin str., 4.
Phone: 7 (495) 438-11-83.
Fax: 7 (495) 438-49-65.
E-mail: i_menzinskaya@oparina4.ru

Образец цитирования:

Н.В. Долгушина, И.В. Менжинская, О.С. Безнощенко,
С.М. Муллабаева, Е.А. Городнова, Л.В. Кречетова
«Профиль антифосфолипидных антител и состояние
системы комплемента у больных COVID-19 разной
степени тяжести» // Медицинская иммунология, 2022.
Т. 24, № 2. С. 351-366.
doi: 10.15789/1563-0625-POA-2465
© Долгушина Н.В. и соавт., 2022

For citation:

N.V. Dolgushina, I.V. Menzhinskaya, O.S. Beznoshchenko,
S.M. Mullabayeva, E.A. Gorodnova, L.V. Krechetova
“Profile of antiphospholipid antibodies and complement system in
COVID-19 patients of different severity”, *Medical Immunology
(Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2022, Vol. 24, no. 2,
pp. 351-366.
doi: 10.15789/1563-0625-POA-2465
DOI: 10.15789/1563-0625-POA-2465

коагулопатии, выявляются на поздней стадии заболевания и могут запустить АФС у предрасположенных пациентов и реконвалесцентов. Хотя аФЛ не ассоциируются с тяжестью COVID-19, персистенция аФЛ в периоде реконвалесценции может быть дополнительным фактором риска тромбозных осложнений. Для больных COVID-19 характерна активация системы комплемента, возрастающая при тяжелой форме заболевания и проявляющаяся подъемом или снижением уровня компонента комплемента С3, повышением уровня С4 в крови и снижением общей активности комплемента. Определение содержания компонентов комплемента С3 и С4 в периоде прогрессирования COVID-19 имеет прогностическое значение в отношении тяжести заболевания.

Ключевые слова: COVID-19, антифосфолипидные антитела, активность комплемента, компонент С3, компонент С4

PROFILE OF ANTIPHOSPHOLIPID ANTIBODIES AND COMPLEMENT SYSTEM IN COVID-19 PATIENTS OF DIFFERENT SEVERITY

Dolgushina N.V., Menzhinskaya I.V., Beznoshchenko O.S., Mullabayeva S.M., Gorodnova E.A., Krechetova L.V.

V. Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow, Russian Federation

Abstract. COVID-19, a severe acute respiratory syndrome caused by SARS-CoV-2, may predispose to thrombotic events, especially when combined with antiphospholipid antibodies (aPL). However, there are limited data on prevalence and antigenic specificity of aPL in COVID-19. Complement activation is assumed to play an important role in pathogenesis of COVID-19-associated coagulopathy. During the SARS-CoV-2 pandemic, it is necessary to identify important biomarkers for predicting severe course of COVID-19 and risk of thrombotic complications. Our objective was to evaluate the aPL profile, quantitative content and activity of complement and its components in COVID-19 patients graded by severity in the course of time.

IgM and IgG antibodies to cardiolipin (CL), phosphatidylserine (PS), β 2-glycoprotein-I (β 2-GP-I), prothrombin (PT), annexin V (An V), as well as C1q complement component, content of its C3 and C4 components and total complement activity were determined in blood serum using ELISA approach. 141 patients with COVID-19 were included in the study. Group 1 consisted of 39 patients with mild form, group 2 (65 patients) presented with moderate form, and group 3 included 37 patients with severe form of COVID-19. Blood samples were obtained on day 3-7 of the disease (1st point) and after 14-28 days (2nd point). The results were as follows: aPL were detected in 29.1% of the total COVID-19 cohort, frequency of aPL detection by the severity grade did not differ (33.3%, 24.6% and 32.4%). In 8.5% of the patients, aPL were detected only at the 1st time point; in 14.2%, only at the 2nd point; and in 6.4% of the cases, at the both time points. Antibodies to PT (16.3%) and An V (11.3%) were revealed more frequently. The detection frequency of antibodies to PT was significantly higher than antibodies to CL and PS (7.1%), β 2-GP-I (7.8%). The prevalence of aPL in groups 1 and 3 did not differ. At the 1st point in group 3, increased levels of C4 (89.2%) and C3 (24.3%) in blood, and a decrease in complement activity (35.1%) were more often observed than in group 1. At the 2nd time point in group 3, a decrease in complement activity was often detected (59.5%). The C3 levels exceeding 720 μ g/ml were found to predict a 2.6-fold increased risk of severe COVID-19, and this risk became 3.3 times higher at C4 levels of > 740 μ g/ml.

The antibodies to PT and An V are often detected in COVID-19 patients, along with low prevalence of antibodies to CL and β 2-GP-I. These antibodies can be involved in pathogenesis of COVID-19-associated coagulopathy, being detectable at the late stage of the disease, and they may trigger APS in predisposed patients and reconvalescents. Although presence of aPL antibodies is not associated with COVID-19 severity, their persistence over the period of convalescence may be an additional risk factor for thromboembolic complications. The COVID-19 patients are characterized by activation of the complement system, which increases in severe cases, and manifests with increased or decreased levels of C3 complement component, increased levels of C4 component in blood, and a decreased total complement activity. Quantitative determination of C3 and C4 complement components over the period of COVID-19 progression is of prognostic value, with respect to severity of the disease.

Keywords: antiphospholipid antibodies, COVID-19, complement, component C3, component C4

Работа выполнена в рамках экспериментального научного исследования 121020500102-4.

Введение

COVID-19 — тяжелая острая респираторная инфекция, вызываемая вирусом SARS-CoV-2, которая ассоциируется с коагулопатией и диссеминированным внутрисосудистым свертыванием (ДВС) [4]. Тромботические осложнения являются распространенными у пациентов с COVID-19 и включают образование тромбов как в крупных сосудах, так и в микроциркуляторном русле легких и других органов [2]. Механизмы COVID-19-ассоциированной коагулопатии включают активацию коагуляции, эндотелиопатию, повышение врожденного и адаптивного иммунитета и активности системы комплемента [19, 23]. Особенно неблагоприятно сочетание коагулопатии при COVID-19 с антифосфолипидными антителами (аФЛ), способными вызывать протромботические эффекты [36]. При этом наличие аФЛ может быть как проявлением антифосфолипидного синдрома (АФС), так и транзиторным, что наблюдается и при других острых инфекциях [3].

Наличие в крови антител класса М и/или G к кардиолипину (КЛ) и/или к β 2-гликопротеину-1 (β 2-ГП-1) и волчаночного антикоагулянта (ВА), выявленное дважды с интервалом в 12 недель, относится к лабораторным критериям АФС, представляющего собой системное аутоиммунное заболевание, клинически проявляющееся сосудистым тромбозом и/или осложнениями беременности, наиболее часто ранним привычным выкидышем [7]. Диагноз «АФС» ставится при сочетании характерных клинических проявлений и лабораторных критериев. В случае серонегативного АФС, когда при наличии клинических признаков АФС лабораторные критерии не выявляются, проводят более широкое исследование аФЛ другой специфичности, включая антитела к фосфатидилсерину (ФС), фосфатидилэтаноламину (ФЭ), протромбину (ПТ), аннексину V (Ан V), антитела класса А к КЛ, β 2-ГП-1 и другие [32].

Наличие аФЛ может повысить риск тромбоза при COVID-19 [36]. В настоящее время имеются ограниченные данные о частоте встречаемости аФЛ во время инфекции, вызванной SARS-CoV-2, и их антигенной специфичности. Не ясно, является ли повышение аФЛ транзиторным и вовлекаются ли аФЛ в нарушения гемостаза при COVID-19. В нескольких отчетах сообщается о наличии аФЛ у отдельных больных COVID-19 и в небольших когортах пациентов, однако представленные данные ограничены и имеют противоречивые результаты [6, 13, 14, 35]. Некоторые исследователи предполагают важную роль аФЛ при COVID-19, в то время как другие отмечают

слабую корреляцию между аФЛ и тромботическими событиями.

При COVID-19 наблюдается нарушение функции и повреждение эндотелиальных клеток с развитием эндотелиопатии, что впоследствии приводит к повреждению тканей и тромбозу. При этом развитию эндотелиопатии, кроме аутоиммунного ответа, может способствовать активация комплемента, что подтверждается обнаружением тромбогенной эндотелиопатии с отложением компонента C5b-9 мембраноатакующего комплекса (MAC) и C4d в материале биопсии, полученном от больных COVID-19 [12].

Коагуляция и врожденный иммунитет являются главными механизмами в защите от вторжения патогенов, при этом система комплемента играет интегральную роль между врожденным иммунитетом и гемостатическим путем [19]. Комплемент является важным компонентом врожденного иммунного ответа на многие патогены, включая вирусы, и инициатором провоспалительных реакций [22, 26]. Система комплемента, представленная набором сериновых протеаз, рецепторов и ингибиторов, усиливает сигналы опасности и потенцирует воспалительные реакции [23]. Однако чрезмерная или нерегулируемая активация комплемента может привести к повреждению органов и тканей самого организма человека [31]. Данные последних исследований позволяют предположить роль системы комплемента в развитии COVID-19-ассоциированной коагулопатии, поскольку у пациентов с тяжелой формой COVID-19 наблюдается тромбообразование непосредственно в ответ на активацию комплемента [25].

Согласно новым данным, активация комплемента играет важную роль в патогенезе и может определять тяжесть заболевания, вызванного SARS-CoV-2 [20, 23]. Предполагается, что при COVID-19 происходит активация системы комплемента по нескольким путям, включая классический, лектиновый и альтернативный пути, в результате генерируются основной комплементарный опсонин C3b и MAC. Образующиеся при активации комплемента анафилатоксины C3a и C5a рекрутируют нейтрофилы и моноциты, способствуют активации иммунных клеток, включая моноциты/макрофаги, Т- и В-лимфоциты. Это приводит к мощному провоспалительному ответу, особенно со стороны макрофагов и нейтрофилов, включающему экспрессию TNF α , IL-1 β и IL-6. Комбинированные эффекты активации комплемента, дисрегуляционной нейтрофилии, повреждения эндотелия и гиперкоагуляции, по-видимому, являются взаимосвязанными и обуславливают тяжесть течения COVID-19.

В условиях пандемии SARS-CoV-2 требуется выявление надежных и значимых маркеров для быстрого отбора больных COVID-19 с общим ухудшением клинического состояния, повышенным риском развития тромботических осложнений и коагуляционных нарушений.

Цель исследования — оценить профиль антифосфолипидных антител, количественное содержание компонентов и активность комплемента у больных с COVID-19 разной степени тяжести в динамике.

Материалы и методы

Проводилось обсервационное проспективное исследование, в которое были включены пациенты с COVID-19 разной степени тяжести, всего 141 пациент. Группу 1 составили пациенты с легким течением ($n = 39$), группу 2 — пациенты со среднетяжелым течением ($n = 65$), группу 3 — пациенты с тяжелым течением COVID-19 ($n = 37$). Тяжесть COVID-19 устанавливали в соответствии с временными методическими рекомендациями Минздрава России «Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19)». Все пациенты, включенные в исследование, получали антикоагулянтную терапию, вследствие этого в исследовании не было зафиксировано ни одного случая тромбоэмболических осложнений (ТЭО).

Критерии включения: возраст старше 18 лет, подписанное информированное согласие на участие в исследовании.

Критерии не включения: беременность или период лактации у женщин, наследственный дефицит факторов свертывания крови, предрасполагающий к геморрагическим состояниям; пурпура и другие геморрагические состояния; онкологические заболевания на период болезни; наличие трансплантированных органов; ВИЧ-инфекция, сифилис и другие острые инфекционные заболевания; постоянное применение антикоагулянтов/антиагрегантов.

Критерии исключения: необходимость проведения хирургического вмешательства во время COVID-19, отказ пациента от продолжения участия в исследовании.

У пациентов группы 1 (пациенты с легкой формой, находящиеся на амбулаторном лечении) забор крови на исследование проводили дважды: на 3–7-й день болезни (1-я точка) и после выздоровления (через 14–28 дней; 2-я точка). У пациентов групп 2 и 3 забор крови на исследование проводили дважды: при госпитализации (1-я точка) и через 14 дней (2-я точка).

Антифосфолипидные антитела определяли в сыворотке крови с помощью иммуноферментного анализа с использованием наборов фирмы

ORGENTEC Diagnostika GmbH (Германия). Количественное определение антител проводили в соответствии с инструкцией по применению фирмы-производителя, прилагаемой к набору. Оптическую плотность (ОП) измеряли на микропланшетном фотометре MULTISCAN EX (Thermo Electron (Shanghai) Instrument Co., Китай) при длине волны 450 нм. Концентрацию антител в исследуемом образце определяли по 4-параметрической калибровочной кривой зависимости ОП от концентрации антител, построенной в линейно-логарифмических координатах. Референсные значения содержания аФЛ (М, G) составляют: антител к КЛ (аКЛ) класса М — < 7 MPL-Ед/мл, класса G — < 10 GPL-Ед/мл, антител к $\beta 2$ -гликопротеину-1 ($\alpha \beta 2$ -ГП-1) — < 8 Ед/мл, к аннексину V (аАн V) — < 8 Ед/мл, к фосфатидилсерину (аФС) — < 10 Ед/мл, к протромбину (аПТ) — < 10 Ед/мл.

Состояние системы комплемента у пациентов оценивали путем определения содержания в сыворотке крови компонентов комплемента C3 и C4, антител к компоненту комплемента C1q и общей активности системы комплемента.

Для определения содержания компонентов комплемента C3 и C4 в сыворотке крови использовали иммуноферментные наборы AssayPro (США). Концентрацию компонентов комплемента C3 или C4 определяли по среднему значению ОП с использованием калибровочной кривой и учетом фактора разведения. Референсные диапазоны составляли для компонента комплемента C3 750–1350 мкг/мл, для C4 — 160–480 мкг/мл.

Определение антител к компоненту комплемента C1q в сыворотке (плазме) крови проводили методом непрямого твердофазного ИФА с использованием набора ORGENTEC Diagnostika GmbH (Германия), включающего микропланшет с иммобилизованным высокоочищенным компонентом комплемента C1q человека. Референсный диапазон антител к C1q составляет < 10 Ед/мл.

Общую активность комплемента оценивали с помощью функционального теста CH50 (DIA. METRA S.r.l., Италия), предназначенного для качественного определения активности комплемента в сыворотке крови и основанного на эффекте растворения комплекса β -галактозидаза/анти- β -галактозидаза в сыворотке в присутствии молекул C3b, которые образуются при активации комплемента, опосредованной альтернативным путем и усиленной действием C3-конвертазы классического пути. Количество диссоциировавшего комплекса β -галактозидазы, детектируемое в конце ферментативной реакции, отражает способность сыворотки образовывать молекулы

СЗб. Результаты анализа выражали в % от референсного калибратора. При этом референсные значения нормальной активности комплемента составляли 51-150%.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием пакетов прикладных программ Microsoft Office Excel 2010, MedCalc v. 12, Statistica v. 10 (США). С помощью тестов Колмогорова–Смирнова и Шапиро–Уилка оценивали нормальность распределения количественных данных в выборках. При нормальном распределении данные представляли средним арифметическим и стандартным отклонением ($M \pm SD$), для оценки различий в группах применяли методы параметрической статистики (t-тест — для сравнения данных в 2 группах, ANOVA — для сравнения данных в 3 группах). При отклонении от нормального распределения данные представляли медианой (Me) с 95%-ным доверительным интервалом (95% ДИ) и интерквартильным размахом Me ($Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$), для оценки различий между группами применялись методы непараметрической статистики (тест Манна–Уитни — для сравнения данных в 2 группах, тест Краскела–Уоллиса — для сравнения данных в 3 группах). Различия между статистическими величинами считали статистически значимыми при уровне значимости $p < 0,05$. Наличие связи между независимыми переменными и зависимой бинарной переменной оценивали путем проведения ROC-анализа (Receiver Operating Characteristics) и анализа логистической регрессии. Связь между фактором риска и исходом оценивали по величине показателя отношения шансов (OR).

Результаты

Распространенность аФЛ исследовали в трех группах больных с COVID-19 разной степени тяжести. Характеристика и клинико-anamnestические данные больных COVID-19 представлены в таблице 1. В группах 1 и 2 с легким и среднетяжелым течением COVID-19 преобладали женщины, тогда как в группе 3 с тяжелым течением большую часть составляли мужчины (табл. 1). Пациенты в группах со среднетяжелым и тяжелым течением COVID-19 были старше по возрасту, в этих группах значимо чаще встречались больные в возрасте ≥ 56 лет. У этих больных вероятность развития более тяжелой формы COVID-19 была в 8,1 раз выше (ОШ = 8,1; 95% ДИ (2,86-22,79); $p = 0,0001$). Средний показатель индекса массы тела (ИМТ) был значимо выше при тяжелой форме инфекции. Пациенты с избыточной массой тела и ожирением ($ИМТ \geq 25$ кг/м²) значимо чаще встречались в группе 3, чем в группах 1 и 2, при этом вероятность развития тяжелой формы COVID-19 у данных пациентов была в 3,5 раза

выше (ОШ = 3,5; 95% ДИ (1,46-8,34); $p = 0,009$). Сердечно-сосудистые заболевания, артериальная гипертензия и сахарный диабет чаще наблюдались у больных со среднетяжелой и тяжелой формой COVID-19, чем у больных с легким течением COVID-19. При этом риск развития более тяжелой формы COVID-19 у больных с данными заболеваниями был выше, соответственно, в 3,7 раза (ОШ = 3,7; 95% ДИ (1,42-9,55)), в 3,3 раза (ОШ = 3,3; 95% ДИ (1,28-8,4)) и в 14,1 раза (ОШ = 14,1; 95% ДИ (1,69-116,60)) ($p < 0,05$).

Антифосфолипидные антитела классов М и G различной специфичности суммарно в двух точках измерения были обнаружены у 41 (29,1%) больного с COVID-19 разной степени тяжести (табл. 2), при этом частота выявления аФЛ в трех группах не различалась. У 12 (8,5%) пациентов аФЛ выявлялись только в 1-й точке измерения в разгар заболевания, у 20 (14,2%) — только во 2-й точке в период реконвалесценции и у 9 (6,4%) как в 1-й, так и во 2-й точке измерения. Суммарное количество пациентов с персистенцией аФЛ во время болезни и повышенным уровнем аФЛ в периоде реконвалесценции составило 29 (20,6%), соответственно, по группам 7 (17,9%), 11 (16,9%) и 11 (29,7%) больных ($p = 0,27$).

Антитела к ПТ классов М и G выявлялись наиболее часто суммарно у 22 (15,6%) пациентов, IgM — у 14 (9,9%), IgG — у 10 (7,1%), причем у 14 (9,9%) больных антитела обнаруживались в периоде реконвалесценции. Частота выявления антител к ПТ в трех группах значимо не различалась (табл. 2). У 16 (11,3%) больных COVID-19 были обнаружены антитела к Ан V, при этом IgM-антитела выявлялись у 9 (6,4%), IgG — у 8 (5,7%) больных. Частота выявления антител к ПТ классов М и G была значимо выше, чем антител к КЛ и ФС (у 10 (7,1%)) и $\beta 2$ -ГП-I (у 11 (7,8%) больных) ($p = 0,025$; $p = 0,042$). При этом IgM-антитела к КЛ и ФС были обнаружены у 7 (5%) больных, IgM-антитела к $\beta 2$ -ГП-I — у 8 (5,7%). IgG-антитела к КЛ были выявлены у 3 (2,1%) пациентов, к ФС и $\beta 2$ -ГП-I — у 4 (2,8%) пациентов. Значимых различий в частоте выявления антител разной специфичности в трех группах не отмечалось, хотя IgM-антитела к Ан V в группе 3 выявлялись чаще по сравнению с группой 2 ($p = 0,005$).

Частота выявления аФЛ разной специфичности классов М и G в исследуемых группах пациентов в 1-й и 2-й точках измерения представлена в таблице 3. Значимого различия в распространенности аФЛ у пациентов с COVID-19 в зависимости от степени тяжести заболевания не обнаружено ни в периоде разгара заболевания, ни в периоде реконвалесценции.

Уровень аФЛ у серопозитивных пациентов в 31 (75,6%) случае соответствовал низкому диа-

ТАБЛИЦА 1. ХАРАКТЕРИСТИКА И КЛИНИКО-АНАМНЕСТИЧЕСКИЕ ДАННЫЕ БОЛЬНЫХ С COVID-19 РАЗНОЙ СТЕПЕНИ ТЯЖЕСТИ

TABLE 1. CHARACTERISTICS AND CLINICAL AND ANAMNESTIC DATA OF PATIENTS WITH COVID-19 OF DIFFERENT SEVERITY

Показатель Parameter		Группа 1 Group 1 n = 39	Группа 2 Group 2 n = 65	Группа 3 Group 3 n = 37	Значение p p value
Пол Gender	мужчины men	7 (17,9%)	24 (36,9%)	22 (59,5%)	0,0009***
	женщины women	32 (82,1%)	41 (63,1%)	15 (40,5%)	
Возраст, лет Age, years		38 (34-54)	60 (43-78)	63 (53-71)	0,0001**
Возраст ≥ 56 лет Age ≥ 56 years		8 (20,5%)	41 (63,1%)	25 (67,6%)	< 0,0001***
ИМТ, кг/м ² BMI, kg/m ²		25,2±4,4	27,4±6,2	29,1±5,3	0,0092*
ИМТ ≥ 25 кг/м ² BMI ≥ 25 kg/m ²		19 (48,7%)	34 (52,3%)	29 (78,4%)	0,0138***
Хронические заболевания легких Chronic lung diseases		4 (10,3%)	10 (15,4%)	5 (13,5%)	0,7596***
Сердечно-сосудистые заболевания Cardiovascular diseases		7 (17,9%)	29 (44,6%)	13 (35,1%)	0,0218***
Артериальная гипертензия Arterial hypertension		13 (33,3%)	40 (61,5%)	23 (62,2%)	0,0101***
Сахарный диабет Diabetes mellitus		1 (2,6%)	15 (23,1%)	10 (27,0%)	0,0096***
ЛОР-заболевания ENT disorders		10 (25,6%)	9 (13,8%)	1 (2,7%)	0,0164***
Ревматические болезни Rheumatic diseases		2 (5,1%)	4 (6,1%)	3 (8,1%)	0,8638***
ТЭО в анамнезе History of TEC		0	1 (1,5%)	1 (2,7%)	0,6052***

Примечание. * – M±SD, ANOVA; ** – Me (X-Y), тест Краскела-Уоллиса; *** – абс. число (%), χ^2 -тест.

Note: *, M±SD, ANOVA; **, Me (X-Y), Kruskal-Wallis test; ***, abs. number (%), χ^2 -test

пазону концентраций (< 20 Ед/мл) и только в 10 случаях соответствовал среднему диапазону концентраций (20-60 Ед/мл), в частности 6 случаев IgM-антител к ПТ, 2 случая IgG-антител к Ан V, 1 случай IgG-антител к ПТ и 1 случай IgM-антител к β 2-ГП-I и ФС. Антифосфолипидные антитела в среднем титре выявлялись как в группах 1 и 2 (по 4 случая, 10,3% и 6,2%), так и в группе 3 (2 случая, 5,4%) ($p > 0,05$).

У больных COVID-19 во всех трех группах средний уровень аФЛ соответствовал нормальному диапазону концентраций как в 1-й, так и во 2-й точке измерения. Однако в группе 3 во 2-й точке измерения был выявлен более высокий средний уровень IgM-антител к Ан V (3,97±2,46 Ед/мл), чем в группах 1 и 2 (2,55±1,36 Ед/мл; 2,47±2,26 Ед/мл) ($p = 0,003$),

а также IgG-антител к ФС (3,54±2,39 Ед/мл) по сравнению с группами 1 и 2 (2,92±1,08 Ед/мл; 2,33±1,64 Ед/мл) ($p = 0,004$). В то же время в группе 1 в 1-й точке измерения отмечался более высокий средний уровень IgM- и IgG-антител к Ан V (3,51±1,75 Ед/мл; 4,64±3,37 Ед/мл), чем в группе 2 (2,22±1,16 Ед/мл; 2,87±2,01 Ед/мл) и в группе 3 (2,97±1,57 Ед/мл; 3,78±1,74 Ед/мл) ($p < 0,0001$; $p = 0,002$), а также более высокий уровень IgG-антител к ПТ (5,24±3,45 Ед/мл), чем в группах 2 и 3 (3,95±1,85 Ед/мл; 4,84±2,06 Ед/мл) ($p = 0,025$).

При сравнении среднего уровня антител в двух точках измерения была отмечена тенденция к снижению уровня практически всех аФЛ класса М во 2-й точке в периоде реконвалесценции (диапазон коэффициента регрессии $r = 0,20-0,80$,

ТАБЛИЦА 2. ЧАСТОТА ВЫЯВЛЕНИЯ АНТИФОСФОЛИПИДНЫХ АНТИТЕЛ КЛАССОВ М И G СУММАРНО И ПО ВИДАМ СПЕЦИФИЧНОСТИ У БОЛЬНЫХ COVID-19 РАЗНОЙ СТЕПЕНИ ТЯЖЕСТИ

TABLE 2. FREQUENCY OF DETECTION OF ANTIPHOSPHOLIPID ANTIBODIES OF CLASSES M AND G IN TOTAL AND BY TYPE OF SPECIFICITY IN PATIENTS WITH COVID-19 OF DIFFERENT SEVERITY

Параметр Parameter	Группа 1 Group 1 n = 39	Группа 2 Group 2 n = 65	Группа 3 Group 3 n = 37	Значение p p value
аФЛ IgM + IgG aPL IgM + IgG	14 (35,9%)	15 (23,1%)	12 (32,4%)	0,72
аФЛ IgM aPL IgM	8 (20,5%)	9 (13,8%)	10 (27%)	0,26
аФЛ IgG aPL IgG	7 (17,9%)	6 (9,2%)	6 (16,2%)	0,38
аβ2-ГП-I IgM + IgG aβ2-GP-I IgM + IgG	4 (10,3%)	6 (9,2)	1 (2,7%)	0,39
аβ2-ГП-I IgM aβ2-GP-I IgM	3 (7,7%)	4 (6,2)	1 (2,7%)	0,35
аβ2-ГП-I IgG aβ2-GP-I IgG	1 (2,6%)	2 (3,1%)	1 (2,7%)	0,96
аКЛ IgM + IgG aCL IgM + IgG	3 (7,7%)	5 (7,7%)	2 (5,4%)	0,89
аКЛ IgM aCL IgM	3 (7,7%)	3 (4,6%)	1 (2,7%)	0,32
аКЛ IgG aCL IgG	0	2 (3,1%)	1 (2,7%)	0,41
аФС IgM + IgG aPS IgM + IgG	3 (7,7%)	5 (7,7%)	2 (5,4%)	0,89
аФС IgM aPS IgM	3 (7,7%)	3 (4,6%)	1 (2,7%)	0,32
аФС IgG aPS IgG	0	2 (3,1%)	2 (5,4%)	0,16
аПТ IgM + IgG aPT IgM + IgG	9 (23,1%)	7 (10,8%)	6 (16,2%)	0,24
аПТ IgM aPT IgM	5 (12,8%)	4 (6,2%)	5 (13,5%)	0,94
аПТ IgG aPT IgG	4 (10,3%)	3 (4,6%)	3 (8,1%)	0,70
аАн V IgM + IgG aAn V IgM + IgG	6 (15,4%)	3 (4,6%)	7 (18,9%)	0,059
аАн V IgM aAn V IgM	2 (5,1%)	1 (1,5%)	6 (16,2%)	0,053
аАн V IgG aAn V IgG	4 (10,3%)	2 (3,1%)	2 (5,4%)	0,35

Примечание. Абс. число (%), χ^2 -тест при сравнении показателей трех групп.

Note. Abs. number (%), χ^2 is a test when comparing the parameters of three groups.

$p < 0,0001$), исключение составили IgM-антитела к Ан V в группе с тяжелым течением COVID-19, уровень которых напротив значимо повысился ($2,97 \pm 1,57$ Ед/мл в 1-й точке; $3,97 \pm 2,46$ Ед/мл во 2-й точке) ($p = 0,04$). Аналогичная тенденция к снижению во 2-й точке наблюдалась в динамике изменения уровня аФЛ класса G, однако у па-

циентов с тяжелым течением инфекции отмечалась тенденция к росту уровня IgG-антител к КЛ ($2,65 \pm 1,44$ Ед/мл в 1-й точке, $2,92 \pm 1,81$ Ед/мл во 2-й точке) и ПТ ($4,84 \pm 2,06$ Ед/мл в 1-й точке; $5,07 \pm 2,65$ Ед/мл во 2-й точке) ($p > 0,05$). Таким образом, значимой связи между персистенцией аФЛ и тяжестью течения COVID-19 не обнаруже-

ТАБЛИЦА 3. ЧАСТОТА ВЫЯВЛЕНИЯ АНТИФОСФОЛИПИДНЫХ АНТИТЕЛ КЛАССОВ М И G У БОЛЬНЫХ COVID-19 РАЗНОЙ СТЕПЕНИ ТЯЖЕСТИ В ДВУХ ТОЧКАХ ИЗМЕРЕНИЯ

TABLE 3. FREQUENCY OF DETECTION OF ANTIPHOSPHOLIPID ANTIBODIES OF CLASSES M AND G IN PATIENTS WITH COVID-19 OF DIFFERENT SEVERITY AT TWO MEASUREMENT POINTS

Параметр Parameter	Группа 1 Group 1 n = 39	Группа 2 Group 2 n = 65	Группа 3 Group 3 n = 37	Значение р p value
аКЛ IgM, 1-я т. aCL IgM, 1 st p.	1 (2,6%)	3 (4,6%)	1 (2,7%)	0,82
аКЛ IgM, 2-я т. aCL IgM, 2 nd p.	2 (5,1%)	2 (3,1%)	1 (2,7%)	0,82
аКЛ IgG, 1-я т. aCL IgG, 1 st p.	0	1 (1,5%)	0	0,56
аКЛ IgG, 2-я т. aCL IgG, 2 nd p.	0	2 (3,1%)	1 (2,7%)	0,61
аβ2-ГП-I IgM, 1-я т. aβ2-GP-I IgM, 1 st p.	1 (2,6%)	3 (4,6%)	1 (2,7%)	0,82
аβ2-ГП-I IgM, 2-я т. aβ2-GP-I IgM, 2 nd p.	2 (5,1%)	4 (6,2%)	1 (2,7%)	0,74
аβ2-ГП-I IgG, 1-я т. aβ2-GP-I IgG, 1 st p.	1 (2,6%)	1 (1,5%)	1 (2,7%)	0,90
аβ2-ГП-I IgG, 2-я т. aβ2-GP-I IgG, 2 nd p.	0	1 (1,5%)	0	0,56
аАн V IgM, 1-я т. aAn V IgM, 1 st p.	1 (2,6%)	0	1 (2,7%)	0,42
аАн V IgM, 2-я т. aAn V IgM, 2 nd p.	2 (5,1%)	1 (1,5%)	5 (13,5%)	0,042
аАн V IgG, 1-я т. aAn V IgG, 1 st p.	2 (5,1%)	1 (1,5%)	1 (2,7%)	0,56
аАн V IgG, 2-я т. aAn V IgG, 2 nd p.	2 (5,1%)	1 (1,5%)	1 (2,7%)	0,56
аФС IgM, 1-я т. aPS IgM, 1 st p.	1 (2,6%)	3 (4,6%)	1 (2,7%)	0,82
аФС IgM, 2-я т. aPS IgM, 2 nd p.	2 (5,1%)	2 (3,1%)	1 (2,7%)	0,82
аФС IgG, 1-я т. aPS IgG, 1 st p.	0	2 (3,1%)	2 (5,4%)	0,36
аФС IgG, 2-я т. aPS IgG, 2 nd p.	0	1 (1,5%)	0	0,56
аПТ IgM, 1-я т. aPT IgM, 1 st p.	3 (7,7%)	1 (1,5%)	2 (5,4%)	0,29
аПТ IgM, 2-я т. aPT IgM, 2 nd p.	2 (5,1%)	3 (4,6%)	4 (10,8%)	0,47
аПТ IgG, 1-я т. aPT IgG, 1 st p.	3 (7,7%)	1 (1,5%)	1 (1,5%)	0,25
аПТ IgG, 2-я т. aPT IgG, 2 nd p.	2 (5,1%)	2 (3,1%)	3 (8,1%)	0,53

Примечание. См. примечание к таблице 2.

Note. As for Table 2.

но, однако обращает на себя внимание высокая частота выявления антител к ПТ и Ан V у больных COVID-19 по сравнению с критериальными антителами, а также значительная распространенность аФЛ у реконвалесцентов.

Особый интерес представляла оценка состояния системы комплемента у больных COVID-19 разной степени тяжести. Исследование содержания компонентов комплемента С3 и С4 в крови и общей активности системы комплемента в тесте СН50 выявило активацию системы комплемента у всех больных независимо от степени тяжести заболевания. В 1-й точке измерения отмечалось повышение уровня компонента С4 в крови, более выраженное при тяжелых формах заболевания, при этом частота выявления повышенного уровня С4 в группе 3 (у 33 (89,2%)) была значимо выше, чем в группе 1 (у 27 (69,2%); $p = 0,034$), а в группе 2 (у 52 (80%)) не различалась с таковой в группе 1 ($p = 0,21$). Вероятность повышения содержания С4 у больных с тяжелой формой COVID-19 была выше в 3,7 раза, чем у больных с легкой формой (ОШ = 3,67; 95% ДИ (1,06-12,68); $p = 0,04$). У пациентов в группах 1 и 2 часто наблюдалось снижение уровня компонента С3 (у 24 (61,5%) и у 37 (56,9%)), значимо чаще, чем повышение этого показателя (у 3 (7,7%) и у 5 (7,7%); $p < 0,0001$). В группе 3 частота выявления снижения (у 16 (43,2%)) и повышения (у 9 (24,3%)) уровня С3 значимо не различалась, однако повышенный уровень С3 выявлялся в группе 3 значимо чаще, чем в группах 1 и 2 ($p = 0,049$; $p = 0,02$).

Общая активность комплемента по результатам теста СН50 была снижена в группе 1 у 4 (10,3%), в группе 2 у 18 (27,7%) и в группе 3 у 13 (35,1%) пациентов, частота выявления снижения активности комплемента в группах 2 и 3 была значимо выше, чем в группе 1 ($p = 0,036$; $p = 0,01$). Вероятность снижения общей активности комплемента в группе 3 была в 4,7 раза выше, чем в группе 1 (ОШ = 4,7; 95% ДИ (1,38-16,3); $p = 0,014$). Такие же тенденции к изменению показателей комплемента наблюдались и во 2-й точке измерения. Однако в группе 3 значимо реже отмечалось повышение уровня С4 (у 18 (48,6%); $p = 0,0002$), и наоборот чаще выявлялось снижение общей активности комплемента (у 22 (59,5%); $p = 0,037$). Вероятность снижения общей активности комплемента во 2-й точке измерения в группе 3 была в 6,7 раза выше, чем в группе 1 (ОШ = 6,7; 95% ДИ (2,35-16,3); $p = 0,0004$).

В таблице 4 представлены содержание компонентов комплемента С3, С4, антител к С1q в крови и общая активность комплемента (СН50) у больных с COVID-19 разной степени тяжести в динамике в двух точках измерения. Средний уровень С3 в 1-й точке в разгар заболевания соответ-

ствовал нормальному диапазону концентраций, при этом у пациентов группы 3 с тяжелым течением болезни был значимо выше, чем в группах 1 и 2. Этот показатель также повышался во 2-й точке, однако значимого изменения уровня С3 в динамике не отмечалось. Средний уровень С4 в 1-й точке в трех группах был выше верхней границы нормального диапазона концентраций, а у пациентов в группе 3 был значимо выше, чем в группе 1, и не различался между группами во 2-й точке. При этом отмечалось значимое снижение уровня С4 в периоде реконвалесценции по сравнению с уровнем в периоде разгара заболевания.

Средний показатель общей активности комплемента в тесте СН 50 в 1-й точке соответствовал нормальному диапазону, однако был значимо ниже в группе 3 по сравнению с группами 1 и 2, при этом в периоде реконвалесценции отмечалось снижение этого показателя ниже нормы по сравнению с таковым в начале заболевания. Средние уровни антител к С1q у больных COVID-19 разной степени тяжести соответствовали нормальному диапазону концентраций как в 1-й, так и во 2-й точках измерения. Повышение уровня антител к С1q наблюдалось только в 3 случаях у больных с легкой формой COVID-19 во 2-й точке измерения. При этом у данных пациентов наблюдалась выраженная активация системы комплемента с повышением уровня компонента комплемента С4, компонент комплемента С3 был повышен только в одном случае. При тяжелой форме COVID-19 средний уровень антител к С1q соответствовал нормальному, однако был значимо ниже, чем при легкой и среднетяжелой форме. Среднее содержание антител к С1q в крови у больных с легкой, средней или тяжелой формой COVID-19 в 1-й и 2-й точках не различалось, значения p составляли 0,69, 0,087 и 0,44 соответственно. С помощью ROC-анализа были найдены пороговые значения показателей содержания компонентов комплемента С3 и С4 в крови, отличающие пациентов с тяжелым течением COVID-19 от пациентов с легким течением COVID-19. Пороговое значение компонента С3 в периоде разгара заболевания составило 720 мкг/мл, компонента С4 — 740 мкг/мл. Определение содержания компонентов комплемента С3 и С4 в крови позволяло эффективно дифференцировать пациентов с легкой и тяжелой формой COVID-19 и характеризовалось достаточно высокими показателями чувствительности, специфичности, AUC и положительной прогностической значимости в отношении тяжелой формы COVID-19 (табл. 5) При этом вероятность развития тяжелой формы COVID-19 у пациентов с уровнем С3 в крови в периоде разгара заболевания > 720 мкг/мл была выше в 2,6 раза (ОШ = 2,6;

ТАБЛИЦА 4. СОДЕРЖАНИЕ КОМПОНЕНТОВ КОМПЛЕМЕНТА C3 И C4, АНТИТЕЛ К C1q В КРОВИ И ОБЩАЯ АКТИВНОСТЬ КОМПЛЕМЕНТА (CH50) У БОЛЬНЫХ COVID-19 РАЗНОЙ СТЕПЕНИ ТЯЖЕСТИ

TABLE 4. CONTENT OF COMPLEMENT COMPONENTS C3 AND C4, ANTIBODIES TO C1q IN THE BLOOD AND THE TOTAL COMPLEMENT ACTIVITY (CH50) IN PATIENTS WITH COVID-19 OF DIFFERENT SEVERITY

Параметр Parameter	Группа 1 Group 1 n = 39	Группа 2 Group 2 n = 65	Группа 3 Group 3 n = 37	Значение p p value
C3, мкг/мл, 1 т. C3, µg/ml, 1 st p.	777,3±431,8	786,6±345,1	1026,4±501,4	0,0095 0,9038*; 0,0213**; 0,0047***
C3, мкг/мл, 2 т. C3, µg/ml, 2 nd p.	902,0±436,2 p = 0,2323^	813,7±359,6 p = 0,6724^	1012,3±482,0 p = 0,8861^	0,0985 0,3066*; 0,3408**; 0,0300***
C4, мкг/мл, 1 т. C4, µg/ml, 1 st p.	676,1±221,9	738,3±287,2	793,8±271,5	0,1602 0,2488*; 0,0416**; 0,3414***
C4, мкг/мл, 2 т. C4, µg/ml, 2 nd p.	543,6±197,7 p = 0,0106^	588,8±208,8 p = 0,0015^	542,8±232,9 p = 0,0001^	0,5019 0,3214*; 0,9866**; 0,3409***
CH50, %, 1 т. CH50, %, 1 st p.	71,3±16,3	74,9±35,5	60,1±27,9	0,0504 0,5473*; 0,0355**; 0,0315***
CH50, %, 2 т. CH50, %, 2 nd p.	62,2±17,4 p = 0,0262^	61,3±36,2 p = 0,0384^	47,2±30,9 p = 0,0720^	0,0796 0,8889*; 0,0197**; 0,0664***
aC1q, Ед/мл, 1 т. aC1q, U/ml, 1 st p.	3,81±1,27	3,37±1,70	2,70±1,02	0,0030 0,1596*; < 0,0001**; 0,0328***
aC1q, Ед/мл, 2 т. aC1q, U/ml, 2 nd p.	4,07±4,49 p = 0,7244^	2,94±1,57 p = 0,0323^	2,47±1,23 p = 0,4840^	0,0352 0,0790*; 0,0487**; 0,1390***

Примечание. M±SD, ANOVA; *, **, *** – значение P при сравнении показателей в группах с легкой и средней, легкой и тяжелой, средней и тяжелой формами COVID-19, соответственно (t-тест); ^ – сравнение динамики показателей в каждой группе в 1-й и 2-й точке (t-тест для связанных выборок).

Note. M±SD, ANOVA; *, **, *** the P value when comparing parameters in groups with mild and moderate, mild and severe, moderate and severe forms of COVID-19, respectively (t-test); ^, comparison of the dynamics of parameters in each group at the 1st and 2nd point (t-test for related samples).

ТАБЛИЦА 5. ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ КОМПОНЕНТОВ КОМПЛЕМЕНТА C3 И C4 В ПЕРИОДЕ РАЗГАРА COVID-19 ДЛЯ РАЗВИТИЯ ТЯЖЕЛОЙ ФОРМЫ ЗАБОЛЕВАНИЯ

TABLE 5. DIAGNOSTIC VALUE OF DETERMINING THE CONTENT OF COMPLEMENT COMPONENTS C3 AND C4 IN THE PERIOD OF COVID-19 PROGRESSION FOR THE DEVELOPMENT OF SEVERE DISEASE

Параметр Parameter	CV, мкг/мл CV, µg/ml	Se, %	Sp, %	PPV, %	NPV, %	AUC, 95% ДИ	Значение p p value
Компонент комплемента C3 Complement component C3	> 720	61,5	62,2	60,7	62,9	0,670 (0,552-0,773)	0,006
Компонент комплемента C4 Complement component C4	> 740	62,2	66,7	63,9	65,0	0,647 (0,529-0,753)	0,021

Примечание. CV – значение критерия, Se – чувствительность, Sp – специфичность, PPV – положительная прогностическая значимость, NPV – отрицательная прогностическая значимость, AUC – площадь под ROC-кривой, p – уровень значимости.

Note. CV, the value of the criterion, Se, sensitivity, Sp, specificity, PPV, positive prognostic significance, NPV, negative prognostic significance, AUC, the area under the ROC curve, P, the significance level.

95% ДИ (1,04-6,6); $p = 0,041$), а при уровне С4 в крови > 740 мкг/мл — в 3,3 раза (ОШ = 3,3; 95% ДИ (1,28-8,42); $p = 0,013$). Как показал логистический регрессионный анализ, диагностическая точность тестов для определения компонентов комплемента С3 и С4 в крови в отношении развития тяжелой формы COVID-19 составляла, соответственно, 61,8% и 63,2% ($p = 0,019$; $p = 0,037$).

Обсуждение

По результатам исследования мужской пол, более старший возраст, избыточная масса тела и ожирение являются безусловными факторами риска тяжести COVID-19, что согласуется с данными других исследований. Пациенты со среднетяжелой и тяжелой формой болезни значимо чаще страдали от сердечно-сосудистых заболеваний, включая артериальную гипертензию, и от сахарного диабета 2-го типа. Для мужчин характерен более высокий уровень экспрессии протеина ACE2 в альвеолярных эпителиоцитах, чем у женщин [33]. Возможно, именно поэтому мужчины болеют COVID-19 более тяжело, чем женщины. Были получены доказательства того, что избыточная масса тела и ожирение в 2,3 раза повышают шансы развития тяжелых форм инфекции, о чем свидетельствуют данные мета-анализа [8, 15]. Это связано с частым сочетанием ожирения с соматическими, эндокринными заболеваниями, метаболическими расстройствами и иммунными нарушениями [1].

У больных COVID-19 отмечается предрасположенность к провоспалительным и гиперкоагуляционным состояниям, повышенному риску тромботических событий и нарушению коагуляции. В ранних сообщениях предполагалась возможная корреляция между аФЛ и COVID-19-ассоциированной коагулопатией, описывались отдельные случаи тромбоза, ассоциированные с позитивностью на антитела к КЛ и 2-ГП-I класса А, у пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями в анамнезе [35]. Однако Harzallah и соавт. выявили позитивность на IgG- и/или IgM-антитела к КЛ и 2-ГП-I только у 10% пациентов [18]. Другие исследования показали низкую распространенность аФЛ и предположили, что аФЛ не могут быть вовлечены в механизм COVID-19-ассоциированной коагулопатии и тромбоза [6, 13]. Предполагается, что определение профиля аФЛ, включающего как критерияльные, так и некритерияльные антитела, может быть полезным в оценке риска тромботических событий у больных COVID-19 [11].

Результаты нашего исследования также показывают низкую частоту выявления у больных COVID-19 антител к КЛ и 2-ГП-I. Однако обращает на себя внимание более высокая распро-

страненность у данных пациентов антител к ПТ и Ан V. При этом у большинства позитивных на аФЛ больных COVID-19 отмечался низкий уровень антител и только у 7,1% пациентов с разной степенью тяжести заболевания наблюдался средний уровень антител. Считается, что в большинстве случаев аФЛ, появляющиеся при вирусных инфекциях, являются транзиторными. Однако в недавнем обзоре показано, что в 71% случаев у больных с вирус-ассоциированными аФЛ развиваются тромботические события [3]. Предполагается, что некоторые транзиторные аФЛ обладают протромботическим потенциалом. Хотя низкие титры аФЛ не являются предикторами тромботических событий при АФС, важно отметить, что при COVID-19 острое системное воспаление с активацией комплемента могут привести к активации и повреждению эндотелия. В этой ситуации при высокой плотности накопления фосфолипид-связывающих протеинов, таких как 2-ГП-I, аннексин V и протромбин, на фосфолипидной поверхности активированного эндотелия даже низкие титры аФЛ могут оказывать патогенное действие, способствуя образованию тромбов. Аналогичная ситуация наблюдается при акушерском АФС, при котором аФЛ даже в низких титрах могут нанести существенный вред вследствие высокого содержания фосфолипид-связывающих протеинов в плаценте.

Полученные результаты свидетельствуют об отсутствии какой-либо явной связи тяжести инфекции с персистенцией аФЛ. Повышение уровня аФЛ классов М и G наблюдалось у больных COVID-19 как с легким, так и тяжелым течением заболевания. Очевидно, что даже при легкой форме инфекции возможна избыточная активация эндотелия сосудов, экстернализация фосфолипидов, повышение содержания фосфолипид-связывающих протеинов (2-ГП-I, Ан V и ПТ) на поверхности поврежденного эндотелия и повышенное образование аФЛ. При сравнении частоты выявления аФЛ, измеренных в динамике в двух точках, после перенесенной инфекции у значительной части пациентов сохранялась персистенция аФЛ или наблюдалось появление аФЛ в периоде реконвалесценции. При этом в группе 3 с тяжелым течением COVID-19 отмечалась тенденция к повышению частоты выявления антител к ПТ и Ан V в периоде реконвалесценции, что свидетельствует о большей вероятности персистенции аФЛ при тяжелой форме инфекции. Продолжающийся рост уровня некоторых аФЛ, в частности антител к ПТ и Ан V, в группе 3 даже после перенесенной инфекции может свидетельствовать о наличии активации эндотелия и, как следствие, его тромбогенности и повышенном риске тромбоэмболических осложнений в пери-

оде реконвалесценции у больных, перенесших тяжелую форму инфекции.

Особый интерес представляют полученные результаты о преобладании у больных COVID-19 по частоте встречаемости антител (М, G) к ПТ, которые выявлялись значимо чаще, чем критерияльные антитела к КЛ и β 2-ГП-I, и обнаруживались даже в периоде реконвалесценции. Кроме того, у больных COVID-19 с высокой частотой выявлялись антитела к аннексину V. Полученные результаты согласуются с данными Cristiano A. и соавт. (2021), демонстрирующими у больных COVID-19 низкую частоту выявления антител к КЛ и β 2-ГП-I и наличие антител к ПТ и Ан V [9].

Сообщается, что аФЛ могут продуцироваться временно в течение нескольких недель у некоторых пациентов с критической формой инфекции, вызванной SARS-CoV-2 [6]. Однако у некоторых генетически предрасположенных пациентов COVID-19 может спровоцировать возникновение АФС или других аутоиммунных заболеваний [8, 33]. Предлагается проводить дополнительное обследование пациентов, перенесших COVID-19, после выздоровления на аФЛ для выявления возможного позднего вторичного АФС, возникшего в ходе заболевания или в период реконвалесценции, который может повысить риск тромбоза, особенно у пожилых пациентов. При этом для полной клинической манифестации АФС требуется активация комплемента.

У больных COVID-19 активация системы комплемента способствует развитию протромботического состояния и провоспалительного ответа, что обуславливает тяжесть течения заболевания. Результаты определения содержания в крови компонентов комплемента C3 и C4 и показателя общей активности комплемента в тесте CH50 в нашем исследовании показали активацию системы комплемента у всех больных COVID-19 независимо от степени тяжести заболевания. При этом активация системы комплемента в период разгара заболевания проявлялась повышением уровня компонента C4, который участвует в классическом пути активации комплемента, запускаемом под воздействием IgM/IgG в комплексе антиген-антитело, а также снижением или повышением уровня компонента комплемента C3, участвующего как в классическом, так и в лектиновом пути активации комплемента, который активируется углеводными фрагментами патогенов. Эти два пути сходятся на этапе образования комплекса C2bC4b, действующего как C3-конвертаза и облегчающего расщепление C3 на C3a и C3b [5, 27, 28]. Кроме того, альтернативный путь комплемента, представляющий собой петлю амплификации C3, может вносить до 80% в активацию комплемента [17, 24, 34]. Ключевые

эффекторы комплемента включают опсонины, маркирующие груз для фагоцитоза (C1q, C3b и C4b), анафилатоксины (C3a и C5a), являющиеся активаторами иммунитета широкого спектра действия, и MAC, который вызывает лизис клеток и может быть иммуномодулятором [20, 23].

Получены доказательства, свидетельствующие о том, что комплемент хронически активируется при тяжелой форме COVID-19 и, учитывая его потенциал, универсальность и быстроту, хорошо подходит в качестве мишени для лекарственной терапии этого заболевания [10, 25]. Согласно данным последних исследований, активация компонента C3 комплемента усугубляет течение заболевания при остром респираторном дистресс-синдроме, ассоциированном с SARS-CoV-2, а ингибирование C3 может облегчить воспалительные осложнения легких [16]. Ингибирование C3 может одновременно блокировать образование C3a и C5a, а также внутрилегочную активацию C3 и высвобождение IL-6 из альвеолярных макрофагов или других клеток, которые экспрессируют рецепторы C3a (C3aRs) и/или рецепторы C5a (C5aRs), тем самым уменьшая повреждение легких [31].

Наблюдаемое нами значимое снижение C4 во 2-й точке измерения могло быть связано с потреблением C4 в процессе активации системы комплемента и его истощением в периоде реконвалесценции. Активация системы комплемента была наиболее выражена у пациентов с тяжелым течением COVID-19, что проявлялось значимо более высоким уровнем C4 в крови, изменением уровня C3 в сторону его снижения или повышения и более низкой общей активностью комплемента в тесте CH50. Как показал ROC-анализ и логистический регрессионный анализ, определение содержания компонентов комплемента C3 и C4 в крови в период разгара COVID-19 может быть полезным для прогнозирования с высокой вероятностью развития тяжелой формы заболевания. Включение компонентов C3 и C4 в панель исследуемых биомаркеров может способствовать более раннему терапевтическому вмешательству с применением антикомплемментарных препаратов и предупреждению развития тяжелой формы COVID-19.

Содержание IgG-антител к субкомпоненту комплемента C1q, который является пусковым компонентом классического пути активации комплемента, при тяжелой форме COVID-19 соответствовало нормальному диапазону, однако было значимо ниже, чем при легкой и среднетяжелой форме, по-видимому, за счет взаимодействия антител с молекулами C1q, связанными с комплексами антиген-антитело и с фосфолипидными поверхностями, в частности поверхностью

поврежденного эндотелия сосудов. Повышение уровня антител к C1q наблюдалось только в 3 случаях при легкой форме заболевания на фоне выраженной активации системы комплемента. Показано, что при наличии в тканях иммунных комплексов, содержащих C1q, антитела к C1q могут усиливать местную активацию комплемента и повреждение тканей, а также активацию комплемента на апоптотических клетках [30]. В настоящее время анти-C1q антитела рассматриваются как отдельный вид аФЛ, а C1q как ФЛ-связывающий протеин, ассоциируются с активацией комплемента и способны ее усиливать путем увеличения количества связанного IgG и дополнительного генерирования C3 по классическому пути, а также за счет связывания с C1q на фосфолипидной поверхности активированных или поврежденных клеток без участия иммунных комплексов [21, 29].

Заключение

Таким образом, клиничко-анамнестическими факторами риска развития более тяжелых форм COVID-19 являются мужской пол, более высокий ИМТ (≥ 25 кг/м²), возраст старше 60 лет, наличие сердечно-сосудистых заболеваний, артериальной гипертензии и сахарного диабета. У больных COVID-19 при низкой распространенности критериальных антител к КЛ и $\beta 2$ -ГП-I

часто выявляются антитела к протромбину и аннексину V, которые могут вовлекаться в патогенез COVID-19-ассоциированной коагулопатии, детектируются на поздней стадии заболевания и могут запустить АФС у предрасположенных пациентов и реконвалесцентов. Уровень аФЛ во время прогрессирования заболевания не связан с тяжестью COVID-19, персистенция аФЛ в периоде реконвалесценции может быть дополнительным фактором риска тромбоэмболических осложнений не только у больных, но также у реконвалесцентов в постковидном периоде. Для больных COVID-19 характерна активация системы комплемента, возрастающая с повышением тяжести заболевания и проявляющаяся подъемом или снижением уровня компонента комплемента C3, повышением уровня C4 в крови и снижением общей активности системы комплемента вследствие длительной активации системы комплемента во время болезни, потребления и истощения ее компонентов. Определение содержания компонентов комплемента C3 и C4 в периоде разгара COVID-19 имеет прогностическое значение для развития тяжелой формы заболевания.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы / References

1. Долгушина Н.В., Кречетова Л.В., Иванец Т.Ю., Вторушина В.В., Инвиева Е.В., Климов В.А., Сухих Г.Т. Влияние иммунного статуса на тяжесть течения COVID-19 // *Акушерство и гинекология*, 2020. № 9. С. 129-137. [Dolgushina N.V., Krechetova L.V., Ivanets T.Y., Vtorushina V.V., Inviyaeva E.V., Sukhikh G.T. The impact of the immune status on COVID-19 severity. *Akusherstvo i ginekologiya = Obstetrics and Gynecology*, 2020, no. 9, pp. 129-137. (In Russ.)]
2. Зайратьянц О.В., Самсонова М.В., Михалева Л.М., Черняев А.Л., Мишнев О.Д., Крупнов Н.М., Калинин Д.В. Патологическая анатомия COVID-19: Атлас / Под общ. ред. О.В. Зайратьянца. М.: ГБУ «НИИ-ОЗММ ДЗМ», 2020. 140 с. [Zairatyants O.V., Samsonova M.V., Mikhaleva L.M., Chernyaev A.L., Mishnev O.D., Krupnov N.M., Kalinin D.V. Pathological anatomy of COVID-19: Atlas / General ed. O.V. Zairatyants]. Moscow: Research Institute of Health Organization and Medical Management of the Moscow City Health Department, 2020. 140 p.
3. Abdel-Wahab N., Lopez-Olivo M.A., Pinto-Patarroyo G.P., Suarez-Almazor M.E. Systematic review of case reports of antiphospholipid syndrome following infection. *Lupus*, 2016, Vol. 25, pp. 1520-1531.
4. Asakura H., Ogawa H. COVID-19-associated coagulopathy and disseminated intravascular coagulation. *Int. J. Hematol.*, 2021, Vol. 113, no. 1, pp. 45-57.
5. Bohlson S.S., Garred P., Kemper C., Tenner A.J. Complement nomenclature-deconvoluted. *Front. Immunol.*, 2019, Vol. 10, 1308. doi: 10.3389/fimmu.2019.01308.
6. Borghi M.O., Beltagy A., Garrafa E., Curreli D., Cecchini G., Bodio C., Grossi C., Blengino S., Tincani A., Franceschini F., Andreoli L., Lazzaroni M.G., Piantoni S., Masneri S., Crisafulli F., Brugnoli D., Muesan M.L., Salvetti M., Parati G., Torresani E., Mahler M., Heilbron F., Pregnolato F., Pengo M., Tedesco F., Pozzi N., Meroni P.L. Anti-phospholipid antibodies in COVID-19 are different from those detectable in the anti-phospholipid syndrome. *Front. Immunol.*, 2020, Vol. 11, 584241. doi: 10.3389/fimmu.2020.584241.
7. Cervera R. Antiphospholipid syndrome. *Thromb. Res.*, 2017, Vol. 151, Suppl. 1, pp. S43-S47.

8. Choi W.-Y. Mortality rate of patients with COVID-19 based on underlying health conditions. *Disaster Med. Public Health Prep.*, 2021, Vol. 3, pp. 1-16.
9. Cristiano A., Fortunati V., Cherubini F., Bernardini S., Nuccetelli M. Anti-phospholipids antibodies and immune complexes in COVID-19 patients: a putative role in disease course for anti-annexin-V antibodies. *Clin. Rheumatol.*, 2021, Vol. 40, no. 7, pp. 2939-2945.
10. Cugno M., Meroni P.L., Gualtierotti R., Griffini S., Grovetti E., Torri A., Panigada M., Aliberti S., Blasi F., Tedesco F., Peyvandi F. Complement activation in patients with COVID-19: A novel therapeutic target. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2020, Vol. 146, no. 1, pp. 215-217.
11. Devreese K.M.J., Linskens E.A., Benoit D., Peperstraete H. Antiphospholipid antibodies in patients with COVID-19: a relevant observation? *J. Thromb. Haemost.*, 2020, Vol. 18, no. 9, pp. 2191-2201.
12. Favaloro E.J., Lippi G. Maintaining hemostasis and preventing thrombosis in coronavirus disease 2019 (COVID-19)-Part I. *Semin. Thromb. Hemost.*, 2020, Vol. 46, no. 7, pp. 757-762.
13. Galeano-Valle F., Oblitas C.M., Ferreiro-Mazón M.M., Alonso-Muñoz J., del Toro-Cervera J., di Natale M., Demelo-Rodríguez P. Antiphospholipid antibodies are not elevated in patients with severe COVID-19 pneumonia and venous thromboembolism. *Thromb. Res.*, 2020, Vol. 192, pp. 113-115.
14. Gatto M., Perricone C., Tonello M., Bistoni O., Cattelan A.-M., Bursi R., Cafaro G., de Robertis E., Mencacci A., Bozza S., Vianello A., Iaccarino L., Gerli R., Doria A., Bartoloni E. Frequency and clinical correlates of antiphospholipid antibodies arising in patients with SARS-CoV-2 infection: findings from a multicentre study on 122 cases. *Clin. Exp. Rheumatol.*, 2020, Vol. 38, no. 4, pp. 754-759.
15. Gralinski L.E., Bankhead A., Jeng S., Menachery V.D., Proll S., Belisle S.E., Matzke M., Webb-Robertson B.J., Luna M.L., Shukla A.K., Ferris M.T., Bolles M., Chang J., Aicher L., Waters K.M., Smith R.D., Metz T.O., Law G.L., Katze M.G., McWeeney S., Baric R.S. Mechanisms of severe acute respiratory syndrome coronavirus-induced acute lung injury. *mBio*, 2013, Vol. 4, no. 4, e00271-13. doi: 10.1128/mBio.00271-13.
16. Gralinski L.E., Sheahan T.P., Morrison T.E., Menachery V.D., Jensen K., Leist S.R., Whitmore A., Heise M.T., Baric R.S. Complement activation contributes to severe acute respiratory syndrome coronavirus pathogenesis. *mBio*, 2018, Vol. 9, no. 5, e01753-18. doi: 10.1128/mBio.01753-18.
17. Harboe M., Mollnes T.E. The alternative complement pathway revisited. *J. Cell. Mol. Med.*, 2008, Vol. 12, no. 4, pp. 1074-1084.
18. Harzallah I., Debliquis A., Drénou B. Lupus anticoagulant is frequent in patients with COVID-19. *J. Thromb. Haemost.*, 2020, Vol. 18, no. 8, pp. 2064-2065.
19. Iba T., Warkentin T.E., Thachil J., Levi M., Levy J.H. Proposal of the definition for COVID-19-associated coagulopathy. *J. Clin. Med.*, 2021, Vol. 10, no. 2, 191. doi: 10.3390/jcm10020191.
20. Java A., Apicelli A.J., Liszewski M.K., Coler-Reilly A., Atkinson J.P., Kim A.H., Kulkarni H.S. The complement system in COVID-19: friend and foe? *JCI Insight*, 2020, Vol. 5, no. 15, e140711. doi: 10.1172/jci.insight.140711.
21. Kouser L., Madhukaran S.P., Shastri A., Saraon A., Ferluga J., Al-Mozaini M., Kishore U. Emerging and novel functions of complement protein C1q. *Front. Immunol.*, 2015, Vol. 6, 317. doi: 10.3389/fimmu.2015.00317.
22. Li G., Fan Y., Lai Y., Han T., Li Z., Zhou P., Pan P., Wang W., Hu D., Liu X., Zhang Q., Wu J. Coronavirus infections and immune responses. *J. Med. Virol.*, 2020, Vol. 92, no. 4, pp. 424-432.
23. Lo M.W., Kemper C., Woodruff T.M. COVID-19: complement, coagulation, and collateral damage. *J. Immunol.*, 2020, Vol. 205, no. 6, pp. 1488-1495.
24. Lukawska E., Polcyn-Adamczak M., Niemir Z.I. The role of the alternative pathway of complement activation in glomerular diseases. *Clin. Exp. Med.*, 2018, Vol. 18, no. 3, pp. 297-318.
25. Magro C., Mulvey J.J., Berlin D., Nuovo G., Salvatore S., Harp J., Baxter-Stoltzfus A., Laurence J. Complement associated microvascular injury and thrombosis in the pathogenesis of severe COVID-19 infection: A report of five cases. *Transl. Res.*, 2020, Vol. 220, pp. 1-13.
26. Mastellos D.C., Ricklin D., Lambris J.D. Clinical promise of next-generation complement therapeutics. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2019, Vol. 18, no. 9, pp. 707-729.
27. Merle N.S., Church S.E., Fremeaux-Bacchi V., Roumenina L.T. Complement system. Part I – Molecular mechanisms of activation and regulation. *Front. Immunol.*, 2015, Vol. 6, 262. doi: 10.3389/fimmu.2015.00262.
28. Mortensen S.A., Sander B., Jensen R.K., Pedersen J.S., Golas M.M., Jensenius J.C., Golas M.M., Jensenius J.C., Hansen A.G., Thiel S., Andersen G.R. Structure and activation of C1, the complex initiating the classical pathway of the complement cascade. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 2017, Vol. 114, no. 5, pp. 986-991.
29. Ohmura K., Oku K., Kitaori T., Amengual O., Hisada R., Kanda M., Shimizu Y., Fujieda Y., Kato M., Bohgaki T., Horita T., Yasuda S., Sugiura-Ogasawara M., Atsumi T. Pathogenic roles of anti-C1q antibodies in recurrent pregnancy loss. *Clin. Immunol.* 2019, Vol. 203, pp. 37-44.
30. Potlukova T., Kralikova P. Complement component C1q and anti-C1q antibodies in theory and in clinical practice. *Scand. J. Immunol.*, 2008, Vol. 67, no. 5, pp. 423-430.
31. Risitano A.M., Mastellos D.C., Huber-Lang M., Yancopoulou D., Garlanda C., Ciceri F., Lambris J.D. Complement as a target in COVID-19? *Nat. Rev. Immunol.*, 2020, Vol. 20, no. 6, pp. 343-344.

32. Rodríguez-García V., Ioannou Y., Fernández-Nebro A., Isenberg D.A., Giles I.P. Examining the prevalence of non-criteria anti-phospholipid antibodies in patients with anti-phospholipid syndrome: a systematic review. *Rheumatology*, 2015, Vol. 54, no. 11, pp. 2042-2050.
33. Sun P., Lu X., Xu C., Sun W., Pan B. Understanding of COVID-19 based on current evidence. *J. Med. Virol.*, 2020, Vol. 92, no. 6, pp. 548-551.
34. Thurman J.M., Holers V.M. The central role of the alternative complement pathway in human disease. *J. Immunol.*, 2006, Vol. 176, no. 3, pp. 1305-1310.
35. Zhang Y., Xiao M., Zhang S., Xia P., Cao W., Jiang W., Chen H., Ding X., Zhao H., Zhang H., Wang C., Zhao J., Sun X., Tian R., Wu W., Wu D., Ma J., Chen Y., Zhang D., Xie J., Yan X., Zhou X., Liu Z., Wang J., Du B., Qin Y., Gao P., Qin X., Xu Y., Zhang W., Li T., Zhang F., Zhao Y., Li Y., Zhang S. Coagulopathy and antiphospholipid antibodies in patients with COVID-19. *N. Engl. J. Med.*, 2020, Vol. 382, no. 17, e38. doi: 10.1056/NEJMc2007575.
36. Zuo Y., Estes S.K., Ali R.A., Gandhi A.A., Yalavarthi S., Shi H., Sule G., Gockman K., Madison J.A., Zuo M., Yadav V., Wang J., Woodard W., Lezak S.P., Lugogo N.L., Smith S.A., Morrissey J.H., Kanthi Y., Knight J.S. Prothrombotic autoantibodies in serum from patients hospitalized with COVID-19. *Sci. Transl. Med.*, 2020, Vol. 12, no. 570, eabd3876. doi: 10.1126/scitranslmed.abd3876.

Авторы:

Долгушина Н.В. — д.м.н., заместитель директора, руководитель департамента организации научной деятельности ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Менжинская И.В. — д.м.н., ведущий научный сотрудник ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Безнощенко О.С. — врач клинической лабораторной диагностики ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Authors:

Dolgushina N.V., PhD, MD (Medicine), Deputy Director, Head, Department of Research Management, V. Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow, Russian Federation

Menzhinskaya I.V., PhD, MD (Medicine), Leading Research Associate, V. Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow, Russian Federation

Beznoshchenko O.S., Doctor in Clinical Laboratory Diagnostics, V. Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow, Russian Federation

Муллабаева С.М. — врач клинической лабораторной диагностики ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Городнова Е.А. — к.м.н., заведующая центром научных и клинических исследований ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Кречетова Л.В. — д.м.н., заведующая лабораторией клинической иммунологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Mullabayeva S.M., Doctor in Clinical Laboratory Diagnostics, V. Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow, Russian Federation

Gorodnova E.A., PhD (Medicine), Head, Center for Research and Clinical Studies, Doctor in Clinical Laboratory Diagnostics, V. Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow, Russian Federation

Krechetova L.V., PhD, MD (Medicine), Head, Laboratory of Clinical Immunology, Doctor in Clinical Laboratory Diagnostics, V. Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow, Russian Federation

Поступила 28.12.2021
Отправлена на доработку 05.01.2022
Принята к печати 13.02.2022

Received 28.12.2021
Revision received 05.01.2022
Accepted 13.02.2022

ФЕНОТИПЫ ПОСТВАКЦИНАЛЬНОГО ИММУНИТЕТА ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ВАКЦИНЫ «ЭпиВакКорона» У ЛИЦ, ПЕРЕНЕСШИХ COVID-19

Сизякина Л.П.¹, Андреева И.И.¹, Харитонов М.В.¹, Зайцева Н.С.¹, Любимов Д.С.¹, Закурская В.Я.¹, Тотолян Арег А.^{2,3}

¹ ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Ростов-на-Дону, Россия

² ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера», Санкт-Петербург, Россия

³ ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Создание надежной иммунологической прослойки – основополагающий фактор воздействия на неуклонное развитие пандемии COVID-19, где иммунопрофилактике принадлежат главенствующие позиции. Ввиду отсутствия четких данных о напряженности иммунитета после новой коронавирусной инфекции, для исключения возможности повторного вовлечения в эпидемический процесс переболевших, актуальной становится задача закрепления иммунологической памяти посредством вакцинации. Между тем, многие вопросы, связанные с вакцинацией лиц, перенесших новую коронавирусную инфекцию, в настоящее время не имеют однозначных ответов. Для изучения особенностей формирования иммунного ответа при использовании у переболевших COVID-19 вакцины на основе пептидных антигенов SARS-CoV-2 («ЭпиВакКорона») проведено наблюдение за 81 участником исследования. Критериями включения служили данные, подтверждающие COVID-19 в анамнезе (медицинская документация), низкий уровень либо отсутствие антител к нуклеокапсидному белку SARS-CoV-2, отрицательный результат ПЦР на наличие вируса SARS-CoV-2. По результатам оценки поствакцинального иммунитета (уровень специфических антител к антигенам пептидной вакцины) на 21-й день после введения первой дозы пациенты разделены на 2 группы: не ответившие и сформировавшие иммунный ответ. С целью выявления причин, лежащих в основе оппозитных фенотипических вариантов гуморального ответа на вакцинацию, проведен сопоставительный анализ изменений показателей В-лимфоцитов в соответствующих группах участников исследования. Методом проточной цитофлуориметрии определяли количество, субпопуляционный состав и активационный потенциал В-лимфоцитов периферической крови, используя соответствующие моноклональные антитела с различным набором цветных меток производства Beckman Coulter. Результаты сопоставления показателей В-лимфоцитов переболевших до введения первой дозы вакцины показали, что у лиц, не ответивших на нее, меньшее число циркулирующих В памяти как в процентом, так и абсолютном исчислении, нежели в группе сравнения, так же как и показатель соотношения субпопуляций В1 и В2. Через 21 день после введения первой дозы, когда был зафиксирован оппозитный вари-

Адрес для переписки:

Сизякина Людмила Петровна
ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, 344022, Россия, г. Ростов-на-Дону, пер. Нахичеванский, 29.
Тел.: 8 (863) 263-44-41.
E-mail: iai3012@rambler.ru

Address for correspondence:

Sizyakina Lyudmila P.
Rostov State Medical University
344022, Russian Federation, Rostov-on-Don, Nakhichevansky lane, 29.
Phone: 7 (863) 263-44-41.
E-mail: iai3012@rambler.ru

Образец цитирования:

Л.П. Сизякина, И.И. Андреева, М.В. Харитонов, Н.С. Зайцева, Д.С. Любимов, В.Я. Закурская, Арег А. Тотолян «Фенотипы поствакцинального иммунитета при использовании вакцины «ЭпиВакКорона» у лиц, перенесших COVID-19» // Медицинская иммунология, 2022. Т. 24, № 2. С. 367-378. doi: 10.15789/1563-0625-PVI-2457
© Сизякина Л.П. и соавт., 2022

For citation:

L.P. Sizyakina, I.I. Andreeva, M.V. Kharitonova, N.S. Zaitseva, D.S. Lyubimov, V.Ya. Zakurskaya, Areg A. Totolian "Post-vaccination immunity phenotypes upon usage of EpiVacCorona vaccine in the persons who suffered COVID-19", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2022, Vol. 24, no. 2, pp. 367-378. doi: 10.15789/1563-0625-PVI-2457
DOI: 10.15789/1563-0625-PVI-2457

ант антительного ответа на V1, отличия в параметрах В-лимфоцитов состояли в меньшем процентном и абсолютном количестве регуляторных В-лимфоцитов у не ответивших участников. Кроме того, в группе нон-респондеров меньше, чем в группе сравнения, количество В-лимфоцитов минорной субпопуляции, и, соответственно, значение соотношения B1:B2. Совокупность представленных данных демонстрирует, что отсутствие вторичного иммунного ответа на антигены SARS-CoV-2 пептидной вакцины сопряжено с изменениями дифференцировки B1- и B2-субпопуляций, В-регуляторных лимфоцитов, В-клеток памяти.

Ключевые слова: COVID-19, поствакцинальный иммунитет, постинфекционный иммунитет, В-лимфоциты, ЭпиВакКорона

POST-VACCINATION IMMUNITY PHENOTYPES UPON USAGE OF EpiVacCorona VACCINE IN THE PERSONS WHO SUFFERED COVID-19

Sizyakina L.P.^a, Andreeva I.I.^a, Kharitonova M.V.^a, Zaitseva N.S.^a,
Lyubimov D.S.^a, Zakurskaya V.Ya.^a, Totolian Areg A.^{b, c}

^a Rostov State Medical University, Rostov-on-Don, Russian Federation

^b St. Petersburg Pasteur Research Institute of Epidemiology and Microbiology, St. Petersburg, Russian Federation

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

Abstract. The dominance of reliably immunized population is a fundamental factor in prevention of COVID-19 pandemia, with immune prophylaxis taking a dominant position. Due to lack of clear data on the intensity of specific immunity after a new coronavirus infection, consolidation of immunological memory by vaccination becomes the urgent task, in order to exclude the risk of re-involvement of previously ill patients into the epidemic process. Meanwhile, many questions related to vaccination of COVID-19 survivors do not get distinct answers. To study the features of immune response, using a vaccine based on SARS-CoV-2 peptide antigens (EpiVacCorona), we monitored 81 participants. The inclusion criteria were data confirming COVID-19 in the anamnesis (medical documentation), low levels or absence of antibodies to the SARS-CoV-2 nucleocapsid protein, and negative PCR tests for SARS-CoV-2. When assessing the data of post-vaccinal immunity checked 21 days after 1st dose of the vaccine, the patients were divided into 2 groups: those who did not respond, and those who developed the immune response. In order to identify possible reasons for different phenotypic patterns of humoral response to vaccination, a comparative analysis of B lymphocyte indexes was carried out in these groups. Absolute counts, subpopulation composition and activation potential of peripheral blood B lymphocytes were determined by flow cytometry using appropriate labeled monoclonal antibodies purchased from Beckman Coulter. Comparative analysis of B lymphocyte indexes on the day of first vaccination showed that the persons who did not respond to the vaccine had smaller counts of circulating B cells, i.e., both percentage and absolute cell numbers, than in comparison group, as well as changed ratio of B1-to-B2 subpopulations. After administration of the first vaccine dose (by day +21), in alternative variant of the antibody response to V1, the differences in the parameters of B cells were presented as a smaller percentage and absolute numbers of regulatory B lymphocytes in non-responding participants. Moreover, the contents of minor B cell subpopulations were decreased in the non-responding group than in the comparison group, thus affecting the values of the B1:B2 ratio. In general, the presented data demonstrate that the absence of secondary immune response to antigens of the SARS-CoV-2 peptide vaccine could be associated with altered differentiation of B1 and B2 subpopulations, B regulatory lymphocytes, B memory cells.

Keywords: COVID-19, post-infectious immunity, post-vaccination immunity, B lymphocytes, EpiVacCorona vaccine

Введение

Пандемия COVID-19, вызванная SARS-CoV-2, по-прежнему остается самой актуальной медико-социальной проблемой современности. Основоположающим фактором купирования распространения инфекционного процесса является

формирование иммунной прослойки, что достигается массовой вакцинацией населения [5, 7, 13]. Значимая доля людей, переболевших COVID-19, вносит свой вклад в создание коллективного иммунитета [2, 3, 14]. Однако в настоящее время по-прежнему нет четких представлений о том, обеспечивает ли перенесенная инфекция имму-

нологическую память, если да, то на какой срок, какие условия функционирования иммунной системы необходимы для формирования и поддержания эффективной защиты при повторном контакте с SARS-CoV-2. Тем не менее вакцинация переболевших COVID-19 является повсеместной практикой и, несмотря на имеющиеся рекомендательные позиции о сроках и схемах ее проведения, необходим ответ на ряд вопросов: у всех ли переболевших есть такая необходимость, через какой интервал после болезни вакцинация возможна, достаточно ли одной дозы, каковы прогностические критерии развития эффективного поствакцинального иммунитета на фоне постинфекционного.

Наиболее доступным инструментом оценки самого факта развития иммунного ответа является характеристика количества антител к различным антигенным детерминантам вируса. Несмотря на ведущие позиции клеточных реакций иммунной системы в противовирусном иммунитете, антительный ответ имеет значение в нейтрализации вирусов на внеклеточных этапах распространения, реализации антителозависимых реакций эффекторных клеток врожденного и адаптивного иммунитета. Наконец, полноценный гуморальный ответ, являясь результатом последовательных этапов взаимодействия вспомогательных и эффекторных клеток, служит интегральным показателем согласованности регуляторных механизмов иммуногенеза [1, 12]. В силу этого детальная характеристика В-лимфоцитов при вакцинации лиц, перенесших COVID-19, представляет несомненный интерес с позиции выявления тех особенностей функциональной палитры В-клеток, которые определяют выраженный повторный гуморальный ответ либо его полное отсутствие.

Цель — оценить отличительные особенности функциональных параметров В-лимфоцитов при оппозитном реагировании на введение вакцины «ЭпиВакКорона» [4] у лиц, перенесших новую коронавирусную инфекцию.

Материалы и методы

Участники исследования

Под наблюдением находился 81 человек, перенесший COVID-19 бессимптомно (25 чел.), в легком (41 чел.), среднетяжелом (15 чел.) вариантах течения давностью до 6 мес. (20 чел.), от 6 до 12 мес. (56 чел.), более года (5 чел.), средний возраст составил 44 ± 13 лет, мужчин — 25, женщин — 56. Критериями включения служили данные, подтверждающие COVID-19 в анамнезе (медицинская документация), низкий уровень либо отсутствие антител к нуклеокапсидному белку SARS-CoV-2, отрицательный результат ПЦР на

наличие вируса SARS-CoV-2. По результатам оценки поствакцинального иммунитета на 21-й день после введения первой дозы пациенты разделены на 2 группы: не ответившие и сформировавшие иммунный ответ.

Исследование выполнялось с соблюдением требований Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» с поправками 2000 г., WMA Declaration of Helsinki — Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects (2013), «Правилами клинической практики в Российской Федерации», утвержденными Приказом Минздрава России от 19.06.2003 № 266. Все пациенты в соответствии с протоколом, одобренным Локальным этическим комитетом при ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» (протокол № 10/21 от 20.05.2021) подписывали добровольное информированное согласие на участие в исследовании. Забор венозной крови для исследования производился в день вакцинации, до введения вакцинного препарата и через три недели после. Введение первой дозы вакцины «ЭпиВакКорона» против COVID-19 [4], разработанной ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора», проводилось в соответствии с инструкцией к препарату.

Лабораторные исследования

Исследование постинфекционного иммунитета осуществляли методом иммуноферментного анализа (ИФА) с определением количества IgG антител к нуклеокапсидному белку SARS-CoV-2, выраженном в условных единицах в мл буферного раствора (у.е./мл) (ИФА тест-система производства ФБУН НИИЭМ им. Пастера). В соответствии с условиями производителей, низкими признаны значения, не превышающие 700 у.е./мл. Поствакцинальный иммунитет оценивали с применением ИФА тест-систем SARS-CoV-2-IgG-Вектор (ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора) и определением коэффициента позитивности (КП). Положительным считался результат КП более 1,2. Уровень поствакцинальных антител определяли через 21 день после введения первой дозы вакцины (V1). Непосредственно перед вакцинацией и на 21-й день после осуществлялось исследование биологического материала, полученного из верхних дыхательных путей (мазок из зева и носа) с использованием набора реагентов для выявления РНК коронавируса SARS-CoV-2 методом полимеразной цепной реакции в реальном времени COVID-2019 Amp.

Методом проточной цитофлуориметрии (Cytomics FC 500, США) определяли количество, субпопуляционный состав и активационный по-

тенциал В-лимфоцитов периферической крови, использовали соответствующие моноклональные антитела с различным набором цветных меток: CD19-PE/CD5-FITC/CD45-PC; CD19-FITC/CD25-PE/CD45-PC; CD19-PE/CD27-FITC/CD45-PC; CD19-FITC/CD40-PE/CD45-PC; CD19-FITC/CD86-PE/CD45-PC; CD19-PE/CD5-FITC/CD1d-PC/CD45-ECD (Beckman Coulter, США). Общий уровень сывороточных иммуноглобулинов оценивали методом радиальной иммунодиффузии в геле.

Статистическую обработку полученных результатов проводили при помощи программы STATISTICA 10.0 (США). Описание полученных результатов осуществляли с помощью подсчета медианы (Me) и интерквартильного размаха значений в виде 25 и 75 перцентилей, что в тексте представлено как Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$). Анализируемые показатели не имели нормального распределения (применяли критерий Шапиро–Уилка). Сравнительный анализ групп оценивали по критерию Вилкоксона. Достоверно значимыми считали различия при $p < 0,05$.

Результаты

Анализ иммунологической эффективности вакцинации показал, что не сформировали иммунный ответ на первую дозу «ЭпиВакКороны» 11 человек (13,6%), о чем свидетельствуют значения КП соответствующей тест-системы: 0,08 (0,06-0,12). Средний возраст группы, оцененной как нон-респондеры, составил 42 ± 11 лет, мужчин — 3, женщин — 8; 8 человек перенесли COVID-19 бессимптомно, 2 — в легкой форме, 1 — среднетяжелой, 1 человек перенес инфекцию более года назад, 3 — менее полугода, 7 — в интервале 6-12 месяцев. Полученные результаты отсутствия гуморального ответа на компоненты пептидной вакцины послужили основанием для оценки параметров клеток, обеспечивающих антителогенез, при сопоставлении результатов двух контрольных точек обследования — в день вакцинации, до введения вакцины и через три недели после (табл. 1).

Полученные данные свидетельствует, что значимым отличительным критерием, изменившимся в процессе реализации иммунного ответа на первую дозу пептидной вакцины, является количество циркулирующих клеток В памяти. Число лимфоцитов с фенотипом CD19⁺CD27⁺ в сравнении с данными до вакцинации увеличилось вдвое в относительном исчислении и в три раза при пересчете на общее количество клеток, циркулирующих в кровотоке. Кроме того, зарегистрировано увеличение относительного и абсолютного числа В-клеток, экспрессирующих рецептор к IL-2. Ни один из других оцениваемых

показателей в течение трех недель не изменился, в том числе стабильными оказались уровни сывороточных иммуноглобулинов, так же как и экспрессия рецепторов, ответственных за процессы межклеточной кооперации

Безусловный интерес представил анализ динамики аналогичных показателей у тех испытуемых, кто сформировал выраженный ответ уже на первую дозу. Так, на 21-й день после V1 «ЭпиВакКороны» у 70 человек (86,4%) детектирован уровень поствакцинальных специфических антител при медиане значений КП = 17,76 (13,49-18,2) у.е. Изменения в параметрах функционирования В-звена иммунной системы этой группы наблюдения показаны в таблице 2.

Представленные параметры демонстрируют, что у ответивших на введение одной дозы вакцины в сравнении с данными до вакцинации изменились показатели, отражающие процессы иммунорегуляции в виде увеличения количества В-клеток, экспрессирующих рецепторы к IL-2 и снижения доли В-регуляторных лимфоцитов, обеспечивающих иммуносупрессию. При этом нет динамики параметров, характеризующих дифференцировку других фенотипических вариантов В-лимфоцитов. Также нет различий в показателях сывороточного состава иммуноглобулинов трех классов и количестве клеток.

Полученные результаты стали основанием для сравнительной характеристики изучаемых показателей обеих групп, оппозиционных по способности к развитию иммунного ответа на пептидные антигены SARS-CoV-2 (табл. 3).

Данные таблицы 3 показывают, что до введения первой дозы вакцины статистически значимые отличия отразились на соотношении В1- и В2-лимфоцитов периферического кровотока: у лиц, не ответивших, значение показателя ниже, чем в группе сравнения. Еще одним значимым критерием особенностей реагирования В-звена у нон-респондеров, в сравнении с ответившими, стало меньшее число циркулирующих В памяти как в процентом, так и абсолютном исчислении.

Сопоставление результатов тестирования переболевших COVID-19 через 21 день после введения первой дозы, когда был зафиксирован оппозитивный вариант антительного ответа на V1, представлено в таблице 4.

Данные сравнительного анализа таблицы 4 иллюстрируют, что у не ответивших на первую дозу вакцины через три недели после ее инокуляции, в сравнении с ответившими, снижено относительное и абсолютное содержание циркулирующих клеток минорной субпопуляции В1-лимфоцитов. Это обстоятельство нашло свое отражение в статистически значимых отличиях показателя, отражающего соотношение В1- и

ТАБЛИЦА 1. ДИНАМИКА ПАРАМЕТРОВ В-ЗВЕНА ИММУННОГО ОТВЕТА У ЛИЦ, ПЕРЕБОЛЕВШИХ COVID-19 И НЕ ОТВЕТИВШИХ ЧЕРЕЗ 21 ДЕНЬ НА V1 ПЕПТИДНОЙ ВАКЦИНЫ («ЭпиВакКорона»)

TABLE 1. DYNAMICS OF THE PARAMETERS OF THE B LINK OF THE IMMUNE RESPONSE IN PERSONS WHO HAVE RECOVERED FROM COVID-19 AND DID NOT RESPOND AFTER 21 DAYS TO THE V1 PEPTIDE VACCINE (EpiVacCorona)

Показатель Indicator		До вакцинации Before vaccination	21 день после V1 21 days after V1	p
В1-лимфоциты CD19⁺CD5⁺ B1 lymphocytes CD19 ⁺ CD5 ⁺	%	0,6 (0,35-0,80)	0,4 (0,3-0,5)	p > 0,05
	10 ⁹ /л 10 ⁹ /L	0,007 (0,004-0,015)	0,007 (0,004-0,009)	p > 0,05
В2-лимфоциты CD19⁺CD5⁻ B2 lymphocytes CD19 ⁺ CD5 ⁻	%	7,6 (4,95-8,80)	7,6 (5,80-8,35)	p > 0,05
	10 ⁹ /л 10 ⁹ /L	0,077 (0,058-0,180)	0,144 (0,108-0,150)	p > 0,05
В1:В2		1:13 (1:10-1:19)	1:19 (1:13-1:26)	p > 0,05
Активированные В-лимфоциты CD19⁺CD25⁺ Activated B lymphocytes CD19 ⁺ CD25 ⁺	%	0,3 (0,1-0,4)	0,4 (0,3-0,5)	p < 0,05
	10 ⁹ /л 10 ⁹ /L	0,004 (0,002-0,008)	0,007(0,004-0,011)	p < 0,05
Breg CD19⁺CD5⁺CD1d⁺	%	0,34 (0,20-0,55)	0,23 (0,16-0,36)	p > 0,05
	10 ⁹ /л 10 ⁹ /L	0,005 (0,002-0,010)	0,004 (0,002-0,006)	p > 0,05
Зрелые В-лимфоциты CD19⁺CD27⁻ Mature B lymphocytes CD19 ⁺ CD27 ⁻	%	4,9 (3,7-8,8)	5,6 (5-7)	p > 0,05
	10 ⁹ /л 10 ⁹ /L	0,08 (0,04-0,17)	0,12 (0,09-0,13)	p > 0,05
В памяти CD19⁺CD27⁺ B memory CD19 ⁺ CD27 ⁺	%	0,8 (0,75-1,20)	1,4 (1,35-2,05)	p < 0,01
	10 ⁹ /л 10 ⁹ /L	0,01 (0,013-0,024)	0,028 (0,023-0,035)	p < 0,01
Т-В кооперация CD19⁺CD40⁺ T-B cooperation CD19 ⁺ CD40 ⁺	%	6,5 (4,25-8,15)	5 (4,5-7,0)	p > 0,05
	10 ⁹ /л 10 ⁹ /L	0,09 (0,05-0,16)	0,119 (0,07-0,13)	p > 0,05
АПК-В кооперация CD19⁺CD86⁺ APK-B cooperation CD19 ⁺ CD86 ⁺	%	0,5 (0,35-0,65)	0,5 (0,20-0,85)	p > 0,05
	10 ⁹ /л 10 ⁹ /L	0,009 (0,005-0,011)	0,008 (0,004-0,016)	p > 0,05
IgA, г/л IgA, g/l		2,05 (1,80-2,17)	1,94 (1,74-2,11)	p > 0,05
IgM, г/л IgM, g/l		1,16 (1,11-1,28)	1,27 (1,13-1,41)	p > 0,05
IgG г/л IgG, g/l		12,01 (11,30-12,87)	12,79 (11,36-13,75)	p > 0,05

ТАБЛИЦА 2. ДИНАМИКА ПАРАМЕТРОВ В-ЗВЕНА ИММУННОГО ОТВЕТА У ЛИЦ, ПЕРЕБОЛЕВШИХ COVID-19 И ОТВЕТИВШИХ ЧЕРЕЗ 21 ДЕНЬ НА V1 ПЕПТИДНОЙ ВАКЦИНЫ («ЭпиВакКорона»)

TABLE 2. DYNAMICS OF THE PARAMETERS OF THE B LINK OF THE IMMUNE RESPONSE IN PERSONS WHO HAVE RECOVERED FROM COVID-19 AND RESPONDED 21 DAYS LATER TO THE V1 PEPTIDE VACCINE (EpiVacCorona)

Показатель Indicator		До вакцинации Before vaccination	21 день после V1 21 days after V1	p
B1-лимфоциты CD19⁺CD5⁺ B1 lymphocytes CD19 ⁺ CD5 ⁺	%	0,65 (0,6-0,78)	0,8 (0,5-1,8)	p > 0,05
	10 ⁹ /л 10 ⁹ /L	0,013 (0,01-0,017)	0,015 (0,009-0,032)	p > 0,05
B2-лимфоциты CD19⁺CD5⁺ B2 lymphocytes CD19 ⁺ CD5 ⁺	%	6,3 (5,25-9,32)	6,6 (4,2-9,2)	p > 0,05
	10 ⁹ /л 10 ⁹ /L	0,115 (0,09-0,13)	0,1(0,08-0,17)	p > 0,05
B1:B2		1:8 (1:6-1:15)	1:5 (1:5-1:11)	p > 0,05
Активированные В-лимфоциты CD19⁺CD25⁺ Activated B lymphocytes CD19 ⁺ CD25 ⁺	%	0,4 (0,1-0,6)	0,6 (0,40-0,95)	p < 0,05
	10 ⁹ /л 10 ⁹ /L	0,006 (0,002-0,010)	0,011(0,007-0,020)	p < 0,05
Breg CD19⁺CD5⁺CD1d⁺	%	0,48 (0,29-0,53)	0,64 (0,40-0,95)	p < 0,05
	10 ⁹ /л 10 ⁹ /L	0,008 (0,006-0,010)	0,011 (0,0072-0,0200)	p < 0,05
Зрелые В-лимфоциты CD19⁺CD27⁻ Mature B lymphocytes CD19 ⁺ CD27 ⁻	%	5,7 (4,6-6,9)	5 (4,0-6,9)	p > 0,05
	10 ⁹ /л 10 ⁹ /L	0,1 (0,09-0,11)	0,95 (0,07-0,13)	p > 0,05
В памяти CD19⁺CD27⁺ B memory CD19 ⁺ CD27 ⁺	%	2,2 (1,6-2,9)	1,7 (1,1-4,0)	p > 0,05
	10 ⁹ /л 10 ⁹ /L	0,03 (0,03-0,05)	0,03 (0,020-0,075)	p > 0,05
Т-В кооперация CD19⁺CD40⁺ T-B cooperation CD19 ⁺ CD40 ⁺	%	7,5 (5,25-8,90)	8,5 (6,35-9,65)	p > 0,05
	110 ⁹ /л 10 ⁹ /L	0,119 (0,10-0,14)	0,182 (0,12-0,22)	p > 0,05
АПК-В кооперация CD19⁺CD86⁺ APK-B cooperation CD19 ⁺ CD86 ⁺	%	0,5 (0,4-0,6)	0,6 (0,40-0,65)	p > 0,05
	10 ⁹ /л 10 ⁹ /L	0,009 (0,0056-0,0106)	0,01 (0,007-0,013)	p > 0,05
IgA, г/л IgA, g/l		1,95 (1,06-1,23)	1,69 (1,44-1,81)	p > 0,05
IgM, г/л IgM, g/l		1,16 (1,07-1,23)	1,04 (1,02-1,26)	p > 0,05
IgG г/л IgG, g/l		12,36 (11,73-13,00)	12,94 (11,35-13,5)	p > 0,05

ТАБЛИЦА 3. СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПАРАМЕТРОВ В-ЗВЕНА ИММУННОГО ОТВЕТА ДО ВАКЦИНАЦИИ У ЛИЦ, ПЕРЕБОЛЕВШИХ COVID-19, ОППОЗИТНО ОТВЕТИВШИХ НА V1 ПЕПТИДНОЙ ВАКЦИНЫ («ЭпиВакКорона»)

TABLE 3. COMPARATIVE CHARACTERISTICS OF THE PARAMETERS OF THE B LINK OF THE IMMUNE RESPONSE BEFORE VACCINATION IN PERSONS WHO HAVE HAD COVID-19 WHO OPPOSED THE V1 PEPTIDE VACCINE (EpiVacCorona)

Показатель Indicator		Ответили Responders	Не ответили Non-responders	p
В1-лимфоциты CD19⁺CD5⁺ B1 lymphocytes CD19 ⁺ CD5 ⁺	%	0,65 (0,60-0,78)	0,6 (0,35-0,80)	p > 0,05
	10⁹/л 10 ⁹ /L	0,013 (0,010-0,017)	0,007 (0,004-0,015)	p > 0,05
В2-лимфоциты CD19⁺CD5⁻ B2 lymphocytes CD19 ⁺ CD5 ⁻	%	6,3 (5,25-9,32)	7,6 (4,95-8,80)	p > 0,05
	10⁹/л 10 ⁹ /L	0,115 (0,09-0,13)	0,077 (0,058-0,180)	p > 0,05
В1:В2		1:8 (1:6-1:15)	1:13 (1:10-1:19)	p < 0,05
Активированные В-лимфоциты CD19⁺CD25⁺ Activated B lymphocytes CD19 ⁺ CD25 ⁺	%	0,4 (0,1-0,6)	0,3 (0,1-0,4)	p > 0,05
	10⁹/л 10 ⁹ /L	0,006 (0,002-0,010)	0,004 (0,002-0,008)	p > 0,05
Breg CD19⁺CD5⁺CD1d⁺	%	0,48 (0,29-0,53)	0,34 (0,20-0,55)	p > 0,05
	10⁹/л 10 ⁹ /L	0,008 (0,006-0,010)	0,005 (0,002-0,010)	p > 0,05
Зрелые В-лимфоциты CD19⁺CD27⁻ Mature B lymphocytes CD19 ⁺ CD27 ⁻	%	5,7 (4,6-6,9)	4,9 (3,7-8,8)	p > 0,05
	10⁹/л 10 ⁹ /L	0,1 (0,09-0,11)	0,08 (0,04-0,17)	p > 0,05
В памяти CD19⁺CD27⁺ B memory CD19 ⁺ CD27 ⁺	%	2,2 (1,6-2,9)	0,8 (0,75-1,20)	p < 0,05
	10⁹/л 10 ⁹ /L	0,03 (0,03-0,05)	0,01 (0,013-0,024)	p < 0,05
Т-В кооперация CD19⁺CD40⁺ T-B cooperation CD19 ⁺ CD40 ⁺	%	7,5 (5,25-8,90)	6,5 (4,25-8,15)	p > 0,05
	10⁹/л 10 ⁹ /L	0,119 (0,10-0,14)	0,09 (0,05-0,16)	p > 0,05
АПК-В кооперация CD19⁺CD86⁺ APK-B cooperation CD19 ⁺ CD86 ⁺	%	0,5 (0,4-0,6)	0,5 (0,35-0,65)	p > 0,05
	10⁹/л 10 ⁹ /L	0,009 (0,0056-0,0106)	0,009 (0,005-0,011)	p > 0,05
IgA, г/л IgA, g/l		1,95 (1,06-1,23)	2,05 (1,80-2,17)	p > 0,05
IgM, г/л IgM, g/l		1,16 (1,07-1,23)	1,16 (1,11-1,28)	p > 0,05
IgG, г/л IgG, g/l		12,36 (11,73-13,00)	12,01 (11,30-12,87)	p > 0,05

ТАБЛИЦА 4. СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПАРАМЕТРОВ В-ЗВЕНА ИММУННОГО ОТВЕТА ЧЕРЕЗ 21 ДЕНЬ ПОСЛЕ ВАКЦИНАЦИИ У ЛИЦ, ПЕРЕБОЛЕВШИХ COVID-19, ОППОЗИТНО ОТВЕТИВШИХ НА V1 ПЕПТИДНОЙ ВАКЦИНЫ («ЭпиВакКорона»)

TABLE 4. COMPARATIVE CHARACTERISTICS OF THE PARAMETERS OF THE B LINK OF THE IMMUNE RESPONSE 21 DAYS AFTER VACCINATION IN PERSONS WHO HAVE HAD COVID-19 WHO OPPOSED THE V1 PEPTIDE VACCINE (EpiVacCorona)

Показатель Indicator		Ответили Responders	Не ответили Non-responders	p
В1-лимфоциты CD19⁺CD5⁺ B1 lymphocytes CD19 ⁺ CD5 ⁺	%	0,8 (0,5-1,8)	0,4 (0,3-0,5)	p < 0,01
	10⁹/л 10 ⁹ /L	0,015 (0,009-0,032)	0,007 (0,004-0,009)	p < 0,01
В2-лимфоциты CD19⁺CD5⁺ B2 lymphocytes CD19 ⁺ CD5 ⁺	%	6,6 (4,2-9,2)	7,6 (5,8-8,4)	p > 0,05
	10⁹/л 10 ⁹ /L	0,10 (0,08-0,17)	0,14 (0,11-0,15)	p > 0,05
В1:В2		1:5 (1:50-1:11)	1:19 (1:13-1:26)	p < 0,01
Активированные В-лимфоциты CD19⁺CD25⁺ Activated B lymphocytes CD19 ⁺ CD25 ⁺	%	0,6 (0,40-0,95)	0,4 (0,3-0,5)	p > 0,05
	10⁹/л 10 ⁹ /L	0,011 (0,007-0,020)	0,007 (0,004-0,011)	p > 0,05
Breg CD19⁺CD5⁺CD1d⁺	%	0,64 (0,40-0,95)	0,23 (0,16-0,36)	p < 0,01
	10⁹/л 10 ⁹ /L	0,011 (0,0072-0,0200)	0,004 (0,002-0,006)	p < 0,01
Зрелые В-лимфоциты CD19⁺CD27⁻ Mature B lymphocytes CD19 ⁺ CD27 ⁻	%	5 (4,0-6,9)	5,6 (5-7)	p > 0,05
	10⁹/л 10 ⁹ /L	0,95 (0,07-0,13)	0,12 (0,09-0,13)	p > 0,05
В памяти CD19⁺CD27⁺ B memory CD19 ⁺ CD27 ⁺	%	1,7 (1,1-4,0)	1,4 (1,35-2,05)	p > 0,05
	10⁹/л 10 ⁹ /L	0,03 (0,020-0,075)	0,028 (0,023-0,035)	p > 0,05
Т-В кооперация CD19⁺CD40⁺ T-B cooperation CD19 ⁺ CD40 ⁺	%	8,5 (6,35-9,65)	5 (4,5-7,0)	p > 0,05
	10⁹/л 10 ⁹ /L	0,182 (0,12-0,22)	0,119 (0,07-0,13)	p > 0,05
АПК-В кооперация CD19⁺CD86⁺ APK-B cooperation CD19 ⁺ CD86 ⁺	%	0,6 (0,40-0,65)	0,5 (0,2-0,85)	p > 0,05
	10⁹/л 10 ⁹ /L	0,01 (0,007-0,013)	0,008 (0,004-0,016)	p > 0,05
IgA, г/л IgA, g/l		1,69 (1,44-1,81)	1,94 (1,74-2,11)	p > 0,05
IgM, г/л IgM, g/l		1,04 (1,02-1,26)	1,27 (1,13-1,41)	p < 0,05
IgG г/л IgG, g/l		12,94 (11,35-13,50)	12,79 (11,36-13,75)	p > 0,05

В2-лимфоцитов: у нон-респондеров его значение существенно ниже аналогичного параметра в группе переболевших, показавших высокий уровень поствакцинальных антител. Помимо этого, у нон-респондеров по отношению к группе сравнения снижено количество Breg, ответственных за процессы негативной иммунорегуляции, статистически значимо выше уровень сывороточных иммуноглобулинов класса М.

Обсуждение

Создание надежной иммунологической прослойки — основополагающий фактор воздействия на неуклонное развитие пандемии COVID-19, где иммунопрофилактике принадлежат главенствующие позиции [8, 16]. Ввиду отсутствия четких данных о напряженности иммунитета после новой коронавирусной инфекции, для исключения возможности повторного вовлечения в эпидемический процесс переболевших, актуальной становится задача закрепления иммунологической памяти посредством вакцинации [10]. Проведенные нами исследования отчетливо доказали, что в 86,4% случаев введение перенесшим COVID-19 одной дозы рекомбинантной вакцины на основе пептидных антигенов SARS-CoV-2 уже через три недели формирует высокий антительный ответ. Данные результаты подтверждают факт формирования клеток иммунологической памяти после COVID-19, способных отреагировать на фрагменты S и N структурных белков вируса. Между тем, в 13,6% случаев подобной реакции иммунной системы отмечено не было. Это обстоятельство послужило основанием выяснить те отличительные особенности реагирования В-звена иммунной системы, которые могут определять отсутствие эффекта при повторном контакте с антигенами SARS-CoV-2. Так, нами показано, что у нон-респондеров через 21 день в ответ на антигенное воздействие компонентами пептидной вакцины повысился активационный ресурс В-клеток в виде усиления потенции к восприятию IL-2, так же как и число эффекторных В памяти. Перечисленные изменения отражают факт реакции на вакцину, не приведшей к значимому эффекту в виде продукции специфических антител, в отличие от ответивших на V1 участников исследования. Так, динамика ответа В-звена у респондеров состояла в сопряженном увеличении как активационных потенций В-клеток, так и количества Breg. Очевидно предположить, что согласованное воздействие стимулирующих и супрессорных сигналов отражает адекватность регуляции иммуногенеза в данном случае. Важный аргумент, определяющий отсутствие иммунного ответа у нон-респондеров, был выявлен при

сопоставлении параметров В-звена иммунного ответа оппозитно ответивших участников исследования в день вакцинации. У не ответивших на V1 в периферическом кровотоке было зафиксировано практически трехкратное снижение количества В памяти в сравнении с теми участниками исследования, которые сформировали гуморальный ответ на одну вакцинную дозу. В настоящее время нет сомнений, что инфекция SARS-CoV-2 вызывает канонический Т-клеточно-зависимый В-клеточный ответ с формированием клеток памяти [11, 17]. После повторного воздействия антигена В-клетки памяти дифференцируются в плазмобласты, секретирующие антитела, неотъемлемую часть стратегии защиты, лежащей в основе успеха вакцинации [16], в том числе при новой коронавирусной инфекции [15]. Тот факт, что общее число эффекторных В-клеток памяти в наших исследованиях выше в группе пациентов с высоким уровнем поствакцинального ответа, подтверждает описанные тенденции и может стать основанием для разработки критериев прогноза его эффективности. Еще один отличительный признак реагирования связан с перераспределением В1- и В2-субпопуляций в сравниваемых группах. Так, до вакцинации значение соотношения В1:В2 у нон-респондеров было статистически значимо ниже. Более того, через три недели формирования вторичного иммунного ответа на пептидные антигены SARS-CoV-2 у не ответивших участников исследования не только меньше показатель соотношения В1:В2, но и количество В-лимфоцитов минорной субпопуляции вдвое ниже, чем в группе сравнения. В1 представляют собой уникальную субпопуляцию, отличную от В2 по происхождению, играющую существенную роль в продукции естественных антител, регуляции антителогенеза [6]. Выявленные в наших исследованиях зависимости требуют дальнейшего наблюдения. Отличительная особенность оппозитного ответа переболевших COVID-19 через три недели после вакцинации состоит в разнице количества циркулирующих Breg. В группе нон-респондеров супрессорная функция В-клеток слабее, нежели у ответивших на вакцинацию. Возможно, этот факт является следствием закономерного вовлечения супрессорных механизмов при адекватном вторичном ответе, в то время как отсутствие такового у нон-респондеров не требует подобного механизма регуляции. Следует обратить внимание, что в наших исследованиях все параметры, отражающие возможность межклеточного взаимодействия В-лимфоцитов с Т-клетками либо с антигенпрезентирующими, не имели отличий между сравниваемыми группами.

Заключение

У переболевших COVID-19 формируется иммунологическая память, что подтверждается эффективным гуморальным иммунным ответом через три недели после введения одной дозы пептидной вакцины у 86,4% участников исследова-

ния. Отсутствие вторичного иммунного ответа на антигены SARS-CoV-2 пептидной вакцины сопряжено с изменениями дифференцировки В1- и В2-субпопуляций, В-регуляторных лимфоцитов, В-клеток памяти, но не связано с процессами межклеточной кооперации.

Список литературы / References

1. Козлов В.А., Савченко А.А., Кудрявцев И.В., Козлов И.Г., Кудлай Д.А., Продеус А.П., Борисов А.Г. Клиническая иммунология. Красноярск: Поликор, 2020. 386 с. [Kozlov V.A., Savchenko A.A., Kudryavtsev I.V., Kozlov I.G., Kudlai D.A., Prodeus A.P., Borisov A.G. Clinical immunology]. Krasnoyarsk: Polikor, 2020. 386 p.
2. Попова А.Ю., Андреева Е.Е., Бабура Е.А., Балахонов С.В., Башкетова Н.С., Буланов М.В., Валеуллина Н.Н., Горяев Д.В., Детковская Н.Н., Ежлова Е.Б., Зайцева Н.Н., Историк О.А., Ковальчук И.В., Козловских Д.Н., Комбарова С.В., Курганова О.П., Кутырев В.В., Ломовцев А.Э., Лукичева Л.А., Лялина Л.В., Мельникова А.А., Михайлова О.М., Носков А.К., Носкова Л.Н., Оглезнева Е.Е., Осмоловская Т.П., Патяшина М.А., Пенковская Н.А., Самойлова Л.В., Смирнов В.С., Степанова Т.Ф., Троценко О.Е., Тотолян А.А. Особенности формирования серопревалентности населения Российской Федерации к нуклеокапсиду SARS-CoV-2 в первую волну эпидемии COVID-19 // Инфекция и иммунитет, 2021. Т. 11, № 2. С. 297-323. [Popova A.Yu., Andreeva E.E., Babura E.A., Balakhonov S.V., Bashketova N.S., Bulanov M.V., Valeullina N.N., Goryaev D.V., Detkovskaya N.N., Ezhlova E.B., Zaitseva N.N., Istoriik O.A., Kovalchuk I.V., Kozlovskikh D.N., Kombarova S.V., Kurganova O.P., Kuttyrev V.V., Lomovtsev A.E., Lukicheva L.A., Lyalina L.V., Melnikova A.A., Mikhailova O.M., Noskov A.K., Noskova L.N., Ogлезнева E.E., Osmolovskaya T.P., Patyashina M.A., Penkovskaya N.A., Samoilova L.V., Smirnov V.S., Stepanova T.F., Trotsenko O.E., Totolyan A.A. Features of developing SARS-CoV-2 nucleocapsid protein population-based seroprevalence during the first wave of the COVID-19 epidemic in the Russian Federation. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2021, Vol. 11, no. 2, pp. 297-323. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-FOD-1684.
3. Попова А.Ю., Тотолян А.А. Методология оценки популяционного иммунитета к вирусу SARS-CoV-2 в условиях пандемии COVID-19 // Инфекция и иммунитет, 2021. Т. 11, № 4. С. 609-616. [Popova A.Yu., Totolian A.A. Methodology for assessing herd immunity to the SARS-CoV-2 virus in the context of the COVID-19 pandemic. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2021, Vol. 11, no. 4, pp. 609-616. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-MFA-1770.
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., Рынчук Н.Н., Гинько З.И., Петров В.Н., Моисеева А.А., Торжкова П.Ю., Пьянков С.А., Трегубчук Т.В., Антонен Д.В., Гаврилова Е.В., Максютков 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., Antonen D.V., Gavrilova E.V., Maksyutov R.A. A single blind, placebo-controlled randomized study of the safety, reactogenicity and immunogenicity of the "EpiVacCorona" Vaccine for the prevention of COVID-19, in volunteers aged 18-60 years (phase I-II). *Infektsiya 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. COVID-19: научно-практические аспекты борьбы с пандемией в Российской Федерации / Под ред. А.Ю. Поповой. Саратов: Амирит, 2021. 608 с. [COVID-19: Scientific and practical aspects of combating the pandemic in the Russian Federation / Ed. A.Yu. Popova]. Saratov: Amirit, 2021. 608 p.
6. Baumgart N.A. Hard(y) look at B-1 cell development and function. *J. Immunol.*, 2017, Vol. 199, pp. 3387-3394.
7. 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.
8. Cromer D., Juno J.A., Khoury D., Reynaldi A., Wheatley A.K., Kent S.J., Davenport M.P. Prospects for durable immune control of SARS-CoV-2 and prevention of reinfection. *Nat. Rev. Immunol.*, 2021, Vol. 21, no. 6, pp. 395-404.
9. Ellebedy A.H., Jackson K.J., Kissick H.T., Nakaya H.I., Davis C.W., Roskin K.M., McElroy A.K., Oshansky C.M., Elbein R., Thomas S., Lyon G.M., Spiropoulou C.F., Mehta A.K., Thomas P.G., Boyd S.D., Ahmed R. Defining antigen-specific plasmablast and memory B cell subsets in human blood after viral infection or vaccination. *Nat. Immunol.*, 2016, Vol. 17, no. 10, pp. 1226-1234.

10. Gaebler C., Wang Z., Lorenzi J.C.C., Muecksch F., Finkin S., Tokuyama M., Cho A., Jankovic M., Schaefer-Babajew D., Oliveira T.Y., Cipolla M., Viant C., Barnes C.O., Bram Y., Breton G., Hägglöf T., Mendoza P., Hurley A., Turroja M., Gordon K., Millard K.G., Ramos V., Schmidt F., Weisblum Y., Jha D., Tankelevich M., Martinez-Delgado G., Yee J., Patel R., Dizon J., Unson-O'Brien C., Shimeliovich I., Robbiani D.F., Zhao Z., Gazumyan A., Schwartz R.E., Hatzioannou T., Bjorkman P.J., Mehndru S., Bieniasz P.D., Caskey M., Nussenzweig M.C. Evolution of antibody immunity to SARS-CoV-2. *Nature*, 2021, Vol. 591, no. 7851, pp. 639-644.
11. 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. Patients with acute COVID-19 and COVID-19 convalescents. *Curr. Issues Mol. Biol.*, 2022, Vol. 44, pp. 194-205.
12. Lam J.H., Smith F.L., Baumgarth N. B Cell activation and response regulation during viral infections. *Viral Immunol.*, 2020, Vol. 33, no. 4, pp. 294-306.
13. 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.
14. Popova A.Y., Smirnov V.S., Andreeva E.E., Babura E.A., Balakhonov S.V., Bashketova N.S., Bugorkova S.A., Bulanov M.V., Valeullina N.N., Vetrov V.V., Goryaev D.V., Detkovskaya T.N., Ezhlova E.B., Zaitseva N.N., Istorik O.A., Kovalchuk I.V., Kozlovskikh D.N., Kombarova S.Y., Kurganova O.P., Lomovtsev A.E., Lukicheva L.A., Lyalina L.V., Melnikova A.A., Mikailova O.M., Noskov A.K., Noskova L.N., Oglezneva E.E., Osmolovskaya T.P., Patyashina, M.A., Penkovskaya N.A., Samoilova L.V., Stepanova T.F., Trotsenko O.E., Totolian A.A. SARS-CoV-2 seroprevalence structure of the russian population during the COVID-19 pandemic. *Viruses*, 2021, Vol. 13, 1648. doi: 10.3390/v13081648.
15. Quast I., Tarlinton D. B cell memory: understanding COVID-19. *Immunity*, 2021, Vol. 54, no. 2, pp. 205-210.
16. Sette A., Crotty Sh. Adaptive immunity to SARS-CoV-2 and COVID-19. *Cell*, 2021, Vol. 184, no. 4, pp. 861-880.
17. Turner J.S., Kim W., Kalaidina E., Goss C., Rauseo A.M., Schmit A.J., Hansen L., Kleber M.K., Pusic I., O'Halloran J.A., Presti R.M., Ellebedy A.H. SARS-CoV-2 infection induces long-lived bone marrow plasma cells in humans. *Nature*, 2021, Vol. 595, pp. 421-425.

Авторы:

Сизякина Л.П. — д.м.н., профессор, заведующая кафедрой клинической иммунологии и аллергологии, директор НИИ клинической иммунологии ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Ростов-на-Дону, Россия

Андреева И.И. — д.м.н., профессор кафедры клинической иммунологии и аллергологии ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Ростов-на-Дону, Россия

Харитонов М.В. — к.м.н., заведующая лабораторией клинической иммунологии и аллергологии ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Ростов-на-Дону, Россия

Authors:

Sizyakina L.P., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Clinical Immunology and Allergology, Director, Research Institute of Clinical Immunology, Rostov State Medical University, Rostov-on-Don, Russian Federation

Andreeva I.I., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Clinical Immunology and Allergology, Rostov State Medical University, Rostov-on-Don, Russian Federation

Kharitonova M.V., PhD (Medicine), Head, Laboratory of Clinical Immunology and Allergology, Rostov State Medical University, Rostov-on-Don, Russian Federation

Зайцева Н.С. — к.м.н., доцент кафедры клинической иммунологии и аллергологии ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Ростов-на-Дону, Россия

Любимов Д.С. — к.м.н., доцент кафедры клинической иммунологии и аллергологии ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Ростов-на-Дону, Россия

Закурская В.Я. — ассистент кафедры клинической иммунологии и аллергологии ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Ростов-на-Дону, Россия

Тотolian Арег А. — д.м.н., профессор, академик РАН, 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

Zaitseva N.S., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Clinical Immunology and Allergology, Rostov State Medical University, Rostov-on-Don, Russian Federation

Lyubimov D.S., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Clinical Immunology and Allergology, Rostov State Medical University, Rostov-on-Don, Russian Federation

Zakurskaya V.Ya., Assistant Professor, Department of Clinical Immunology and Allergology, Rostov State Medical University, Rostov-on-Don, Russian Federation

Totolian Areg A., PhD, MD (Medicine), Professor, Full Member, Russian Academy of Sciences, Director, St. Petersburg Pasteur Research Institute of Epidemiology and Microbiology; Head, Department of Immunology, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Поступила 21.12.2021
Принята к печати 16.02.2022

Received 21.12.2021
Accepted 16.02.2022

ДИНАМИКА ИММУННЫХ ИЗМЕНЕНИЙ В ОЧАГЕ ПОВРЕЖДЕНИЯ ПРИ ОКСАЗОЛОН-ИНДУЦИРОВАННОМ ЯЗВЕННОМ КОЛИТЕ НА ФОНЕ ОЗОНОТЕРАПИИ

Давыдова Е.В., Осиков М.В., Кайгородцева Н.В.

ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения
РФ, г. Челябинск, Россия

Резюме. Ключевыми звеньями патогенеза воспалительных заболеваний кишечника являются нарушение иммунорегуляции и формирование аутоиммунного профиля ответа по отношению к антигенам собственной кишечной микробиоты и воспалительно-измененным антигенам колоноцитов. Мультимодальные биологические эффекты озона являются основанием для применения локальной и системной озонотерапии в комплексном лечении практически любых воспалительных заболеваний желудочно-кишечного тракта. Цель работы – изучить влияние внутрибрюшинной и ректальной озонотерапии на иммунные показатели очага повреждения при оксазолон-индуцированном язвенном колите в динамике эксперимента.

Исследование проводили на 64 половозрелых крысах-самцах чистой линии Wistar массой 240 ± 20 г. Моделирование язвенного колита проводилось с помощью оксазолон (4-этоксиметил-2-фенил-2-оксазолин-5-он) (Sigma-Aldrich, США). Озоно-кислородную смесь вводили внутрибрюшинно или ректально в концентрации 1,0-1,2 мг/л ежедневно, 1 раз в сутки, в объеме 10 мл, курс 6 дней.

Исходы эксперимента фиксировали на 2-е, 4-е и 6-е сутки. Концентрацию IL-17 и IL-23 определяли в гомогенате тканей кишечника (Bender Medsystems, Австрия) на анализаторе Personal LAB, экспрессию CD4 и FoxP3 на лимфоцитах кишечника иммуногистохимически (ElisaKit, China)

Повреждение тканей толстого кишечника в динамике оксазолон-индуцированного язвенного колита нарастало от 2-х к 6-м суткам. Общее количество лимфоцитов значимо увеличивалось в динамике экспериментального колита с параллельным снижением численности CD4⁺ лимфоцитов и FoxP3-позитивных Т-лимфоцитов. Концентрация IL-17 и IL-23 в тканях нарастала по мере выраженности воспалительных изменений в очаге повреждения.

Внутрибрюшинное введение озона значимо снизило уровень лимфоцитов в тканях очага поражения на 6-е сутки, с нормализацией количества CD4⁺ и FoxP3-позитивных Т-лимфоцитов к 6-м суткам. Уровни IL-17 и IL-23 нарастали от 2-х к 6-м суткам, с более низким значением IL-23 на 6-е сутки в сравнении с группой животных без лечения.

Ректальное введение ОКС привело к нормализации FoxP3-клеток на 6-е сутки относительно интактных. Уровни провоспалительных цитокинов IL-17 и IL-23 значимо снижались на 6-е сутки в

Адрес для переписки:

Давыдова Евгения Валерьевна
ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный
медицинский университет» Министерства
здравоохранения РФ
454048, Россия, г. Челябинск, ул. Воровского, 64.
Тел.: 8 (351) 232-73-71.
E-mail: davidova-ev.med@yandex.ru

Address for correspondence:

Davydova Evgeniya V.
South Ural State Medical University
454048, Russian Federation, Chelyabinsk, Vorovsky str., 64.
Phone: 7 (351) 232-73-71.
E-mail: davidova-ev.med@yandex.ru

Образец цитирования:

Е.В. Давыдова, М.В. Осиков, Н.В. Кайгородцева
«Динамика иммунных изменений в очаге повреждения
при оксазолон-индуцированном язвенном колите на
фоне озонотерапии» // Медицинская иммунология,
2022. Т. 24, № 2. С. 379-388.
doi: 10.15789/1563-0625-ICA-2467
© Давыдова Е.В. и соавт., 2022

For citation:

E.V. Davydova, M.V. Osikov, N.V. Kaigorodtseva "Immune
changes at the injured sites in oxazolone-induced ulcerous
colitis: Influence of ozone therapy", Medical Immunology
(Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2022, Vol. 24, no. 2,
pp. 379-388.
doi: 10.15789/1563-0625-ICA-2467
DOI: 10.15789/1563-0625-ICA-2467

сравнении с группой животных без лечения, что, вероятно, связано с проявлением противовоспалительных свойств у озона.

Ключевые слова: оксазолон, колит, гомогенат, IL-17, IL-23, Т-хелперы, Т-регуляторные лимфоциты

IMMUNE CHANGES AT THE INJURED SITES IN OXAZOLONE-INDUCED ULCEROUS COLITIS: INFLUENCE OF OZONE THERAPY

Davydova E.V., Osikov M.V., Kaigorodtseva N.V.

South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

Abstract. Impaired immunoregulation and development of autoimmune response to antigens of own intestinal microbiota and inflammation-altered antigens of colonic cells represent the key links in pathogenesis of inflammatory bowel diseases. Multimodal biological effects of ozone presume the usage of local and systemic ozone therapy in complex treatment of many inflammatory diseases of the gastrointestinal tract. The aim of our work was to study effects of intraperitoneal and rectal ozone therapy upon immune parameters of the lesion focus in oxazolone-induced ulcerative colitis in the course of time.

The study was carried out on 64 adult male inbred Wistar rats weighing 240 ± 20 g. Experimental ulcerative colitis was produced by oxazolone treatment (4-ethoxymethylene-2-phenyl-2-oxazolin-5-one) (Sigma-Aldrich, USA). The ozone-oxygen mixture was injected intraperitoneally or rectally at a concentration of 1.0-1.2 mg/l, once a day, in a volume of 10 ml, at the 6-day course.

The results of experiments were recorded on the days +2, +4 and +6. The concentrations of IL-17 and IL-23 was determined in a homogenate of intestinal tissues (Bender Medsystems, Austria) using a Personal LAB analyzer; expression of CD4 and FoxP3 on intestinal lymphocytes was determined by immunohistochemistry technique (ElisaKit, China).

The observed tissue damage of large intestine showed an increase from day 2 to day 6 of oxazolone-induced ulcerative colitis. The total number of lymphocytes significantly increased upon development of experimental colitis, with parallel decrease in the number of CD4⁺ lymphocytes and FoxP3-positive T lymphocytes. IL-17 and IL-23 concentrations in the tissues increased with the severity of inflammatory changes in the lesion focus. Intraperitoneal ozone administration was associated with significant reduction of lymphocyte contents in the damaged tissues on the 6th day, whereas the numbers of CD4⁺ and FoxP3 positive T lymphocytes normalized by the 6th day. The levels of IL-17 and IL-23 increased from day 2 to day 6, with a lower IL-23 values on day 6 as compared with non-treated animals. Rectal administration of ACS led to the normalization of FoxP3 cells on the 6th day to the values of intact animals. The levels of proinflammatory cytokines (IL-17 and IL-23) significantly decreased on the 6th day as compared to the group of animals without treatment, which could be due to anti-inflammatory properties of ozone.

Keywords: oxazolone, colitis, homogenate, IL-17, IL-23, T helpers, T regulatory lymphocytes

Введение

Современные эпидемиологические исследования указывают на неуклонный рост воспалительных заболеваний кишечника (ВЗК) в мире. В различных регионах земного шара частота встречаемости ВЗК имеет достаточную вариабельность от 21 до 268 случаев на 100 тыс. населения, в России составляет 20,4 на 100 тысяч населения [3]. Современные представления

об этиологии и факторах, способствующих развитию заболевания, предполагают совокупное влияние генетических, иммунологических и дисбиотических факторов. В основе патогенеза ВЗК, по мнению ряда авторов [4], лежит нарушение иммунорегуляции и формирование аутоиммунного профиля ответа по отношению к антигенам собственной кишечной микробиоты и воспалительно-измененным антигенам колоноцитов.

Одной из важнейших составляющих здорового кишечника является кишечно-ассоциированная лимфоидная ткань, которая обеспечивает регулируемую и интегрирующую роль между всеми компонентами кишечного барьера.

Изменение морфофункциональных свойств и функции кишечно-ассоциированной лимфоидной ткани приводит к нарушению клеточной сигнализации, опосредованной дефектами распознавания патоген-ассоциированных молекулярных образов микроорганизмов (PAMP) мембраносвязанными Toll-like-рецепторами (TLR), цитоплазматическими NOD-like-рецепторами и сенсорами вирусных РНК — RIG-like-рецепторами с последующим разворачиванием реакций иммунного реагирования [1]. Особую роль в поддержании аутовоспалительного компонента играет активация клеточных и гуморальных механизмов иммунного ответа, дисбаланс Th17/Treg [4, 5, 6].

Сложности в дифференциальной диагностике и верификации ВЗК, требующие инвазивных вмешательств и гистологического исследования материала, нередко затрудняют своевременное выявление заболевания.

Спектр терапевтических подходов к лечению данной патологии кишечника невелик и включает применение производных 5-аминосалициловой кислоты, глюкокортикостероидов, системных иммунодепрессантов, селективных иммунобиологических ингибиторов рецепторов провоспалительных цитокинов, молекул адгезии, стимуляторов роста и дифференцировки иммунных клеток, целью которых является подавление эффекторного действия провоспалительных медиаторов на разных уровнях и этапах воспалительного процесса [2]. Применение последних позволяет значительно увеличить сроки ремиссии, однако эффективность данной терапии снижается спустя 2–3 года применения, а наличие системного иммуносупрессивного эффекта ассоциировано с повышением риска развития оппортунистических инфекций [2].

В связи с этим, поиск новых терапевтических подходов с высоким профилем безопасности, является приоритетным направлением исследований в этой области. На роль неспецифического противовоспалительного лечебного фактора может претендовать системное и локальное применение медицинского озона. Благодаря широкому диапазону биологических эффектов озона, включающих антиоксидантное, иммуномодулирующее, противовоспалительное, трофическое действие, хорошей совместимости с другими видами

терапии применение медицинского озона может занять достойное место в комплексном лечении ВЗК.

Цель работы — изучить влияние внутрибрюшинной и ректальной озонотерапии на иммунные показатели очага повреждения при оксазолон-индуцированном язвенном колите в динамике эксперимента.

Материалы и методы

Дизайн исследования

Постановка эксперимента проводилась в условиях экспериментально-биологической клиники ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России (г. Челябинск). Экспериментальное исследование выполнено на 91 половозрелой крысе-самце чистой линии Wistar массой 240 ± 20 г, находящейся в открытой системе при температуре 18–22 °С, при естественном освещении, в свободном доступе к воде и корму. Животных содержали в открытой системе. Предварительно методом простой рандомизации животные были распределены на 4 группы: 1 ($n = 10$) — интактный контроль, 2 ($n = 27$) — животные с оксазолон-индуцированным язвенным колитом (ОИЯК), 3 ($n = 27$) — животные с ОИЯК в условиях внутрибрюшинного введения озонкислородной смеси (ОКС), 4 ($n = 27$) — животные с ОИЯК в условиях ректального введения ОКС. Разрешение на проведение исследований отражено в протоколе Этического комитета ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России №4 от 22.05.2019 года.

Экспериментальное моделирование язвенного колита

Моделирование язвенного колита проводилось с помощью оксазолон (4-этоксиметил-2-фенил-2-оксазолин-5-он) (Sigma-Aldrich, США). Первый этап включал проведение накожной сенсибилизации путем локального воздействия 150 мкл 3%-ного спиртового раствора оксазолон на межлопаточную область животного. На втором этапе на 8-е сутки животным ректально вводили 150 мкл 3%-ного спиртового раствора оксазолон (оксазолон в растворе ацетона и оливкового масла в соотношении их 4:1) на глубину 7–8 см [3]. Для анестезии был применен препарат «Золетил-100» (МНН: тилетамин гидрохлорид) (VirbacSanteAnimale, Франция) в дозе 20 мг/кг. Документирование наличия язвенного колита осуществляли с помощью морфологического исследования фрагментов тканей очага повреждения.

Проведение озонотерапии

Озонкислородную смесь получали на озонотерапевтической автоматической установке с деструктором озона УОТА-60-01 «Медозон» производства ООО «Медозон», Москва. Забор озонкислородной смеси с установленной расчетной концентрацией озона 1,0–1,2 мг/л, соответственно средней массе животных, производился в пластиковый мешок, далее в шприц объемом 10 мл. Курс озонотерапии составил 6 суток.

Внутрибрюшинно ОКС вводили методом прокола передней брюшной стенки ежедневно, 1 раз в сутки, в объеме 10 мл.

Ректально ОКС применялась в виде ежедневных (1 раз в сутки) ректальных инфузий в объеме 10 мл, на глубину 7 см, с помощью центрального венозного катетера диаметром 1,4 мм (ОАО «Синтез», Курган) в предварительно освобожденную от фекальных масс ампулу прямой кишки.

Методы регистрации исходов эксперимента

Выведение животных из эксперимента проводили на 2-е, 4-е и 6-е сутки путем цервикальной дислокации. Для анестезии применяли препарат «Золетил-100» (МНН: тилетамина гидрохлорид) (Virbac Sante Animale, Франция) в дозе 20 мг/кг.

Отобранные фрагменты тканей толстого кишечника интактных и животных с ОИЯК помещали в маркированные гистологические кассеты и фиксировали 72 часа в 10% нейтральном формалине, с последующим окрашиванием гематоксилином и эозином. Окрашенные срезы использовали для морфологической верификации на микроскопе PrimoStar (CarlZeiss, Германия), с морфометрической установкой Pro150ES (Pixera Corporation, USA). Повреждение тканей толстой кишки оценивали с помощью балльной системы подсчета гистологических изменений, специально разработанных для химически индуцированных ВЗК: 0 баллов — признаки воспаления отсутствуют; 1 — минимальный уровень воспаления с признаками очаговой инфильтрации клетками мононуклеарного ряда (1–2 очага); 2 — умеренно выраженные воспалительные изменения с множественными очагами инфильтрации; 3 — тяжелое воспаление с явлениями патологического ангиогенеза, отеком и утолщением стенок; 4 — максимально выраженные признаки воспалительных изменений с массивной лейкоцитарной инфильтрацией и потерей бокаловидных клеток [15].

Иммуногистохимическая оценка экспрессии CD4 и FoxP3 на лимфоцитах тканей толстого кишечника проводилась с использованием набора

специфических для крыс антител (ElisaKit, Кистай) и высокоадгезивных стекол с положительно заряженной поверхностью (SuperFrostPlus). Постановка иммуногистохимической реакции проводилась в автоматическом иммуногистоштейнере BenchMarkXT (Ventana, США). Для визуализации применяли универсальную систему Ultra VIEW Universal DAB (Ventana, США). Докрашивание препаратов проводили Hematoxylin 2 (Ventana, США) с последующей дегидратацией и помещением под покровное стекло. При увеличении микроскопа $\times 400$ производился подсчет клеток с окрашенными в коричневый цвет ядрами и с более интенсивным окрашиванием ядершек на площади 1 мм² ткани толстого кишечника (ед/мм²).

Определение концентрации IL-23 и IL-17 проводили в гомогенатах образцов ткани толстой кишки с помощью автоматического иммуноферментного анализатора Personal LAB (Италия) с применением тест-систем для крыс фирмы Bender Medsystems (Австрия). Результаты выражали в пг/г белка. С целью стандартизации показателей расчет концентрации цитокинов проводили на 1 г белка.

Статистический анализ проводился с применением пакета программ Statistica 10.0 for Windows. Значения показателей представлены в виде Me ($Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$), где Me — медиана, $Q_{0,25}$ и $Q_{0,75}$ — нижний и верхний квартили соответственно. Сравнение групп производили, используя непараметрические критерии Манна–Уитни, Вальда–Вольфовитца. Значимыми, с учетом поправки Бонферрони, считали различия при $p \leq 0,02$.

Результаты

Повреждение тканей толстого кишечника в динамике оксазолон-индуцированного язвенного колита нарастало от 2-х к 6-м суткам и характеризовалось переходом от низкого уровня воспаления с очаговыми инфильтративными изменениями на 2-е сутки (1,2 (1,1; 1,3) балла) до умеренно выраженных изменений с множественными очагами повреждения слизистой на 4-е сутки (2,2 (2,1; 2,3) балла) и тяжелого воспаления стенки кишки на 6-е сутки (3,2 (3,1; 3,3) балла), с параллельным увеличением размеров язвенных дефектов, что является закономерным следствием оксазолоновой индукции воспалительного процесса в тканях толстого кишечника. Повторное ректальное введение оксазолон вызывает острый воспалительный процесс преимущественно в дистальных отделах толстого

ТАБЛИЦА 1. СОДЕРЖАНИЕ ОТДЕЛЬНЫХ СУБПОПУЛЯЦИЙ ЛИМФОЦИТОВ В СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКЕ ТОЛСТОГО КИШЕЧНИКА ПРИ ОКСАЗОЛОН-ИНДУЦИРОВАННОМ ЯЗВЕННОМ КОЛИТЕ, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

TABLE 1. CONCENTRATION OF FoxP3 IN MUCOSA OF THE LARGE INTESTINE IN EXPERIMENTAL COLITIS, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

Показатель, ед./мм ² Parameter, item/mm ²	Группа 1 Интактные Group 1 Intact (n = 10)	Группа 2 ОИЯК 2-е сутки Group 2 ULNC 2 nd day (n = 10)	Группа 2 ОИЯК 4-е сутки Group 2 ULNC 4 th day (n = 10)	Группа 2 ОИЯК 6-е сутки Group 2 ULNC 6 th day (n = 10)
Лимфоциты Lymphocytes	26,2 (22,2-28,6)	31,4 (28,1-39,3)*	44,3 (38,9-49,3)*	73,9 (68,1-86,3)* # **
CD4 ⁺	12,3 (9,6-13,1)	11,6 (9,4-11,8)	9,8 (7,8-10,2)	8,2 (6,4-9,0)* #
FoxP3	3,5 (3,2-4,3)	3,4 (3,3-4,2)	2,8 (2,2-3,0)* #	2,4 (1,8-2,6)* #

Примечание. * – значимые, согласно критерию Манна–Уитни ($p \leq 0,02$), различия с группой 1; # – с группой 2 (2-е сутки); ** – с группой 2 (4-е сутки).

Note. *, significant differences according to the Mann–Whitney criterion ($p \leq 0.02$) with group 1; #, with group 2 (2 days); **, with group 2 (4 days). ULNC, large intestine in experimental colitis.

ТАБЛИЦА 2. КОНЦЕНТРАЦИЯ ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ В ГОМОГЕНАТЕ ТКАНЕЙ ОЧАГА ПОВРЕЖДЕНИЯ ТОЛСТОГО КИШЕЧНИКА, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

TABLE 2. CONCENTRATION OF SOME CYTOKINES IN SERUM IN EXPERIMENTAL COLITIS, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

Показатель, пг/г белка Parameter, pg/g protein	Группа 1 Интактные Group 1 Intact (n = 10)	Группа 2 ОИЯК 2-е сутки Group 2 ULNC 2 nd day (n = 9)	Группа 2 ОИЯК 4-е сутки Group 2 ULNC 4 th day (n = 9)	Группа 2 ОИЯК 6-е сутки Group 2 ULNC 6 th day (n = 9)
IL-17	6,8 (5,2-7,0)	17,5 (15,8-18,4)*	34,3 (23,8-48,7)* #	56,9 (36,2-64,8)* #
IL-23	42,26 (38,8-49,6)	68,5 (59,4-74,2)*	85,7 (65,7-88,8)* #	98,7 (81,2-112,6)* #

Примечание. * – значимые, согласно критерию Манна–Уитни ($p \leq 0,02$), различия с группой 1; # – с группой 2 (2-е сутки).

Note. *, significant differences according to the Mann–Whitney criterion ($p \leq 0.02$) with group 1; #, with group 2 (2 days). ULNC, large intestine in experimental colitis.

кишечника. Гистопатологические изменения при прогрессировании колита характеризовались отеком подэпителиального пространства, инфильтрацией тканей мононуклеарными клетками, а также нейтрофилами, эозинофилами. Наблюдалось укорочение крипт, уменьшение числа бокаловидных клеток, плотности железистых элементов.

Количество инфильтрирующих слизистую оболочку толстого кишечника лимфоцитов значительно нарастало в динамике ОИЯК от 2-х к 6-м

суткам в сравнении с группой интактных животных (табл. 1). Численность CD4⁺ лимфоцитов и FoxP3-позитивных Т-лимфоцитов, напротив, одновременно значимо снижалась от 2-х к 6-м суткам.

Определение концентрации провоспалительных цитокинов в гомогенате толстого кишечника, играющих важную роль в формировании профиля иммунного ответа при ВЗК, показало значимое увеличение концентрации IL-17 и IL-23 в сравнении с интактными животными и

ТАБЛИЦА 3. СОДЕРЖАНИЕ ОТДЕЛЬНЫХ СУБПОПУЛЯЦИЙ ЛИМФОЦИТОВ И ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ В ОЧАГЕ ПОВРЕЖДЕНИЯ ТОЛСТОГО КИШЕЧНИКА ПРИ ОИЯК, Ме ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

TABLE 3. CONTENT OF INDIVIDUAL SUBPOPULATIONS OF LYMPHOCYTES AND PROINFLAMMATORY CYTOKINES IN THE LESION FOCUS OF THE LARGE INTESTINE IN ULNC, Ме ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

Показатель Parameter	Группа 1 Интактные Group 1 Intact	Группа 2 ОИЯК 2-е сутки Group 2 ULNC 2 nd day	Группа 2 ОИЯК 4-е сутки Group 2 ULNC 4 th day	Группа 2 ОИЯК 6-е сутки Group 2 ULNC 6 th day	Группа 3 ОИЯК озон внутри- брюшинно 2-е сутки Group 3 ULNC intrapertitoneal ozone 2 nd day	Группа 3 ОИЯК озон внутри- брюшинно 4-е сутки Group 3 ULNC intra- pertitoneal ozone 4 th day	Группа 3 ОИЯК озон внутри- брюшинно 6-е сутки Group 3 ULNC intra- pertitoneal ozone 6 th day	Группа 4 ОИЯК озон ректально 2-е сутки Group 4 ULNC ozone rectally 2 nd day	Группа 4 ОИЯК озон ректально 4-е сутки Group 4 ULNC ozone rectally 4 th day	Группа 4 ОИЯК озон ректально 6-е сутки Group 4 ULNC ozone rectally 6 th day
n	10	9	9	9	9	9	9	9	9	9
Лимфоциты, ед./мм ² Lymphocytes, item/mm ²	26,2 (22,2-28,6)	31,4 (28,1-39,3)*	44,3 (38,9-49,3)*	73,9 (68,1-86,3)*	33,5 (29,6-37,8)*	42,3 (37,8-46,2)*	62,5 (54,6-65,2)* #	36,2 (30,1-39,2)*	42,8 (36,4-45,9)*	60,2 (55,6-66,8)* #
CD4 ⁺ , ед./мм ² CD4 ⁺ , item/mm ²	12,3 (9,6-13,1)	11,6 (9,4-11,8)	9,8 (7,8-10,2)	8,2 (6,4-9,0)*	10,9 (9,8-11,9)	9,7 (8,5-10,8)*	9,2 (9,0-11,2)* #	11,3 (9,6-12,0)	9,9 (8,8-11,6)*	9,6 (9,2-11,9)* #
FoxP3, ед./мм ² FoxP3, item/mm ²	3,5 (3,2-4,3)	3,4 (3,3-4,2)	2,8 (2,2-3,0)*	2,4 (1,8-2,6)*	3,3 (3,1-3,9)	3,0 (2,6-3,2)*	2,9 (2,7-3,2)* #	3,2 (3,0-3,8)	3,0 (2,7-3,3)*	3,1 (2,9-3,4)*
IL-17, пг/г белка IL-17, pg/g protein	6,8 (5,2-7,0)	17,5 (15,8-18,4)*	34,3 (23,8-48,7)*	56,9 (36,2-64,8)*	18,9 (16,8-22,3)*	28,9 (24,3-32,6)*	44,3 (38,6-52,5)*	19,3 (15,0-23,1)*	27,9 (23,3-46,2)*	31,5 (28,9-41,5)* #
IL-23, пг/г белка IL-23, pg/g protein	42,26 (38,8-49,6)	68,5 (59,4-74,2)*	85,7 (65,7-88,8)*	98,7 (81,2-112)*	59,3 (50,1-62,1)*	67,4 (58,6-70,1)*	65,2 (58,6-78,9)* #	60,1 (52,3-69,5)*	68,9 (59,6-76,3)*	66,7 (57,1-79,2)* #

Примечание. * – значимые различия, согласно критерию Манна-Уитни ($p \leq 0,02$), с группой 1; # – с соответствующими сутками группы 2.

Note. * , significant differences according to the Mann-Whitney criterion ($p \leq 0.02$) with group 1; # , with the corresponding days of group 2. ULNC, large intestine in experimental colitis.

по мере нарастания воспалительных изменений в очаге повреждения (табл. 2).

Однократное ежедневное внутрибрюшинное введение ОКС на 2-е и 4-е сутки не привело к значимым изменениям численности лимфоцитов, инфильтрирующих ткани кишки и оставалось высоким в сравнении с интактными животными (табл. 3). На 6-е сутки зафиксировано снижение уровня лимфоцитов в тканях очага поражения в сравнении с аналогичным показателем группы 2, тем не менее оставаясь значимо высоким в сравнении с интактными животными. Количество CD4⁺ и FoxP3-позитивных Т-лимфоцитов однонаправленно изменялось на фоне внутрибрюшинной озонотерапии и, начиная с 4-х суток наблюдения, значимо снижалось в сравнении с интактными животными, однако на 6-е сутки фиксировались более высокие показатели, чем в группе, не получающей лечения. Концентрация провоспалительных цитокинов IL-17 и IL-23 значимо нарастала в динамике от 2-х к 6-м суткам, в сравнении с интактными животными, однако уровень IL-23 на 6-е сутки был значимо ниже в сравнении с показателем группы 2.

При ректальном введении ОКС со стороны общей численности лимфоцитов и CD4⁺ клеток зафиксированы аналогичные группе 3 изменения (табл. 3). Количество FoxP3-позитивных клеток значимо снижалось только на 4-е сутки, с нормализацией показателя относительно интактных — к 6-м суткам. Уровни провоспалительных цитокинов IL-17 и IL-23 нарастали от 2-х к 6-м суткам в сравнении с интактными животными, однако на 6-е сутки концентрация обоих цитокинов была значимо ниже, чем в группе 2, что, вероятно, связано с проявлением противовоспалительных свойств у озона.

Обсуждение

Наиболее часто для изучения острых и хронических воспалительных процессов кишечника в экспериментальных условиях находят применение химически индуцированные модели воспаления, сходные по иммунологическим и гистологическим проявлениям с ВЗК человека [1, 3]. Известно, что ректальное введение оксазолон индуцирует воспаление с формированием язвенных дефектов преимущественно в пределах собственной пластинки слизистой оболочки дистальных отделов толстого кишечника. Способность оксазолон связываться с эндогенными протеинами в слизистой оболочке позволяет рассматривать его в качестве гаптена, индуциру-

ющего воспалительный процесс в пределах кишечно-ассоциированной лимфоидной ткани, преимущественно Th2- и TNK-типа [3].

Доказана связь воспалительных изменений слизистой оболочки толстого кишечника с дисбалансом Т-хелперов 1-го, 2-го и 17-го типов, а также минорной субпопуляции Т-регуляторных лимфоцитов (Treg), основными регуляторами дифференцировки которых являются соответственно транскрипционные факторы T-bet, GATA-3, ROR γ t и FoxP3 [1].

Отмечено, что Th17 при ВЗК способны индуцировать и поддерживать процессы локального воспаления за счет активации и рекрутирования в очаг воспаления нейтрофилов, принимать непосредственное участие в аутоиммунных реакциях [6]. Изучение нами концентрации IL-23 продиктовано его непосредственным участием в регуляции образования, дифференцировки Th0 в Th17, экспрессии IL-17, поскольку все продуцирующие интерлейкин-17 клетки имеют общую зависимость от IL-23 и транскрипционного фактора ROR γ t [5]. В динамике оксазолон-индуцированного повреждения толстого кишечника нами зафиксировано закономерное нарастание концентрации обеих цитокинов в гомогенате тканей, что объясняет непосредственное участие данных цитокинов в генерации и поддержании воспаления в толстом кишечнике. Именно IL-17 усиливает миелопоэз в костном мозге, стимулирует выработку гранулоцитарного колоние-стимулирующего фактора (G-CSF), ответственен за рекрутинг нейтрофилов в ткани из кровотока, индукцию синтеза макрофагами хемокинов (IL-8), провоспалительных цитокинов IL-6, IL-1 β , TNF α , фибробластами кишечника — матриксных металлопротеиназ [11]. В связи с этим IL-23 может выступать в качестве интегративного фактора, объединяющего реакции врожденного и адаптивного компартмента иммунной системы в патогенезе ВЗК. Кроме того, обнаруженные нами изменения цитокинов в гомогенате тканей могут служить предпосылками для формирования аутоиммунного профиля иммунного ответа в стенке толстого кишечника. Неким подтверждением данного предположения является значимое снижение в динамике ОИЯК количества в тканях очага повреждения FoxP3-позитивных Т-лимфоцитов (Т-регуляторных клеток), что создает определенный фон для разворачивания аутоиммунных событий на фоне аутовоспалительных изменений в стенке толстого кишечника.

У человека ВЗК развиваются на фоне сочетания ряда этиопатогенетических факторов (генетических мутаций генов NOD2/CARD15, аутофагии Atg16l1, рецептора IL-23, дисбиоза, инфекций, стресса, нарушений питания) в совокупности вызывающих дисфункцию кишечного барьера и повышение его проницаемости. Последнее способствует транслокации микроорганизмов и продуктов их жизнедеятельности в подслизистый слой, что сопровождается активацией иммунных клеток кишечного-ассоциированной лимфоидной ткани, изменением баланса Th17/Treg и продукцией цитокинов с последующим развитием хронического воспаления с аутоиммунным компонентом. Хронизация воспаления приводит к изменению антигенного репертуара колоноцитов, желез, микробиоты, что также способствует поддержанию и прогрессированию аутовоспалительных реакций. Сигнальная ось IL-33/ST2 (ST2 — растворимый стимулирующий фактор роста 2), ответственная за генерацию воспалительных реакций на измененный антигенный гомеостаз микробиоты, реализуется через экспрессию ST2 провоспалительными Т-клетками кишечника, при этом количество защитных ST2-экспрессирующих Treg, напротив, уменьшается [11, 12]. Дисбиотические изменения численности провоспалительных микроорганизмов могут способствовать активизации Т-клеток (Th17), вызывая у генетически восприимчивых индивидуумов Th17-опосредованный аутоиммунный ответ [11].

Применение внутрибрюшинного и ректального способа введения ОКС в лечении ОИЯК показало в целом положительное действие озона и продуктов озонлиза на динамику изучаемых иммунных показателей, характеризующееся значимым, менее выраженным снижением общего числа лимфоцитов и CD4⁺ клеток на 6-е сутки, более низкими уровнями IL-17 и IL-23 на 6-е сутки на фоне озонотерапии в сравнении с аналогичными показателями группы 2, которым не проводилось лечение. Также показано, что содержание FoxP3-позитивных Т-лимфоцитов на 6-е сутки в группе 4, получающей озон в виде ректальных инфузий, достигло значений интактной группы животных. Указанные положительные эффекты озонотерапии могут быть обусловлены мультимодальными свойствами молекулы озона [7, 9, 14]. Опираясь на данные литературы, можно констатировать, что поступление озона в организм приводит сначала к умеренному окислительному стрессу, прежде всего за счет вза-

имодействия с полиненасыщенными жирными кислотами (ПНЖК) и водой, образования АФК, липоперекисей, гидроперекисей, изопростанов, озонидов, 4-гидроксиноненала и других соединений, с последующей мощной активацией антиоксидантных систем клетки. Вполне вероятно, этим можно объяснить несколько отсроченный (на 6-е сутки) положительный эффект озонотерапии, зависящий от активации транскрипционного редокс-фактора Nrf2 и последующим повышением синтеза и активности ферментов антиоксидантной защиты, в частности глутатионтрансферазы [8]. Иммуномодулирующие и противовоспалительные эффекты озона связаны с блокадой активации NF-κB-зависимых путей [13] и последующим снижением синтеза провоспалительных цитокинов, что нами и было продемонстрировано. Озон способен снижать синтез простагландинов, индуцировать синтез протекторных протеинов семейства белков теплового шока, матриксных металлопротеиназ, чем проявляет свои противовоспалительные свойства [13, 14].

Снижение интенсивности воспалительных реакций привело к восстановлению численности Т-регуляторных клеток, что снижает вероятность возникновения аутоиммунных реакций.

Заключение

Способность оксазолон активировать механизмы врожденного иммунитета реализуется на основе альтеративного повреждения химическим агентом эпителия слизистой оболочки толстой кишки. Ректальное введение оксазолон индуцирует воспаление с формированием язвенных дефектов преимущественно в пределах собственной пластинки слизистой оболочки дистальных отделов толстого кишечника, что делает данную модель максимально приближенной к проявлениям язвенного колита у людей.

Применение озонотерапии при оксазолон-индуцированном язвенном колите обнаруживает противовоспалительное действие озона и его дериватов, обусловленное антиоксидантными и ограничивающими активностью клеток в отношении продукции активных радикалов кислорода свойствами, а также способностью модулировать синтез провоспалительных цитокинов, что приводит к уменьшению интенсивности вторичной альтерации в очаге повреждения толстого кишечника и снижает вероятность разворачивания аутоиммунных реакций в стенке кишки, в том числе за счет нормализации количества Т-регуляторных клеток

Список литературы / References

1. Жеребятьев А.С., Камышный А.М. Транскрипционные регуляторы дифференцировки Т-лимфоцитов и паттернраспознающие рецепторы – экспрессия лимфоцитами кишечника при оксазолоновом колите у крыс и после введения ингибитора 3-гидрокси-3-метилглутарил коэнзим А-редуктазы и антагониста рецепторов интерлейкина-1 // Иммунология, 2015. Т. 36, № 3. С. 139-144. [Zherebyatiev A.S., Kamyshnyi A.M. Transcriptional regulators of T-lymphocyte differentiation and pattern recognition receptors – expression by intestinal lymphocytes in oxazolone colitis in rats and after administration of an inhibitor of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A-reductase and an antagonist of interleukin-1 receptors. *Immunologiya = Immunologiya*, 2015, Vol. 36, no. 3, pp. 139-144. (In Russ.)]
2. Лазебник Л.Б., Парфенов А.И., Князев О.В., Конопляников А.Г., Сагынбаева В.Э., Яковлева М.В., Астрелина Т.А., Ручкина И.Н., Щербakov П.Л., Трубицына И.Е., Царегородцева Т.М., Гудкова Р.Б., Рогозина В.А., Чикунова Б.З., Хомерики С.Г., Михайлова З.Ф. Биологическая терапия воспалительных заболеваний кишечника // ЭиКГ, 2011. № 3. С. 42-53. [Lazebnik L.B., Parfenov A.I., Knyazev O.V., Konoplyannikov A.G., Sagynbaeva V.E., Yakovleva M.V., Astrelina T.A., Ruchkina I.N., Shcherbakov P.L., Trubitsyna I.E., Tsaregorodtseva T.M., Gudkova R.B., Rogozina V.A., Chikunova B.Z., Khomeriki S.G., Mikhailova Z.F. Biological therapy of inflammatory intestinal diseases. *EiKG = Experimental and Clinical Gastroenterology*, 2011, no. 3, pp. 42-53. (In Russ.)]
3. Осиков М.В., Симонян Е.В., Листик Е.В., Бакеева А.Е., Бивалькевич В.А. Воспалительные заболевания кишечника: выбор оптимальной экспериментальной модели // Современные проблемы науки и образования, 2017. № 3. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=26524>. [Osikov M.V., Simonyan E.V., Listik E.V., Bakeeva A.E., Bivalkevich V.A. Inflammatory bowel diseases: the choice of the optimal experimental model. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya = Modern Problems of Science and Education*, 2017, no. 3. [Electronic resource]. Access mode: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=26524>. (In Russ.)]
4. Ситкин С.И., Вахитов Т.Я., Демьянова Е.В. Микробиом, дисбиоз толстой кишки и воспалительные заболевания кишечника: когда функция важнее таксономии // Альманах клинической медицины, 2018. Т. 46, № 5. С. 396-425. [Sitkin S.I., Vakhitov T.Ya., Demyanova E.V. Microbiome, colon dysbiosis and inflammatory bowel disease: when function is more important than taxonomy. *Almanakh klinicheskoy meditsiny = Almanac of Clinical Medicine*, 2018, Vol. 46, no. 5, pp. 396-425. (In Russ.)]
5. Ткачев А.В., Мкртчян Л.С., Беловолова Р.А., Девликамова Т.А. Диагностическая значимость иммунологических маркеров при различных формах язвенного колита // Медицинский вестник Северного Кавказа, 2019. Т. 14, № 2. С. 334-338. [Tkachev A.V., Mkrtchyan L.S., Belovolova R.A., Devlikamova T.A. Diagnostic value of immunological markers in various forms of ulcerative colitis. *Meditinskiiy vestnik Severnogo Kavkaza = Medical News of North Caucasus*, 2019, Vol. 14, no. 2, pp. 334-338. (In Russ.)]
6. Третьякова Ю.И. Особенности иммуновоспалительного синдрома у пациентов с язвенным колитом в зависимости от тяжести атаки заболевания // Пермский медицинский журнал, 2018. Т. 35, № 4. С. 39-45. [Tretyakova Yu.I. Features of the immune-inflammatory syndrome in patients with ulcerative colitis, depending on the severity of the disease attack. *Permskiy meditsinskiy zhurnal = Perm Medical Journal*, 2018, Vol. 35, no. 4, pp. 39-45. (In Russ.)]
7. Bai Z., Li X., Liu Y., Deng J., Wang Ch., Li Y., Qi X. Successful treatment of acute-on-chronic liver failure and hemolytic anemia with hepato-protective drugs in combination with intravenous ozone without steroids: A case report. *Intractable Rare Dis. Res.*, 2018, Vol. 7, no. 3, pp. 204-208.
8. Bocci V., Valacchi G. Nrf2 activation as target to implement therapeutic treatments. *Front. Chem.*, 2015, Vol. 3, 4. doi: 10.3389/fchem.2015.00004.
9. Clavo B.N., Santana-Rodríguez P., Llontop P., Gutiérrez D., Suárez G., López L., Rovira G., Martínez-Sánchez G., González E., Jorge I.J., Perera C., Blanco J., Rodríguez-Esparragón F. Ozone therapy as adjuvant for cancer treatment: is further research warranted? *Evid. Based Complement. Alternat. Med.*, 2018, Vol. 2018, 7931849. doi: 10.1155/2018/7931849.

10. Kim Y.M., Pae H.O., Park J.E., Lee Y.C., Woo J.M., Kim N.-H., Choi Y.K., Lee B.-S., Kim S.R., Chung H.-T. Heme oxygenase in the regulation of vascular biology: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxid. Redox Signal*, 2011, Vol. 14, no. 1, pp. 137-167.
11. Lamas B., Richard M.L., Leducq V., Pham H.P., Michel M.L., Da Costa G., Bridonneau C., Jegou S., Hoffmann T.W., Natividad J.M., Brot L., Taleb S., Couturier-Maillard A., Nion-Larmurier I., Merabtene F., Seksik P., Bourrier A., Cosnes J., Ryffel B., Beaugerie L., Launay J.M., Langella P., Xavier R.J., Sokol H. CARD9 impacts colitis by altering gut microbiota metabolism of tryptophan into aryl hydrocarbon receptor ligands. *Nat. Med.*, 2016, Vol. 22, no. 6, pp. 598-605.
12. Lee Y.K., Mazmanian S.K. Has the microbiota played a critical role in the evolution of the adaptive immune system? *Science*, 2010, Vol. 330, no. 6012, pp. 1768-1773.
13. Manoto S.L., Maepa M.J., Motaung S.K. Medical ozone therapy as a potential treatment modality for regeneration of damaged articular cartilage in osteoarthritis. *Saudi J. Biol. Sci.*, 2018, Vol. 25, no. 4, pp. 672-679.
14. Orakdogan M., Uslu S., Emon S.T., Somay H., Meric Z.C., Hakan T. The effect of ozone therapy on experimental vasospasm in the rat femoral artery. *Turk. Neurosurg.*, 2016, Vol. 26, no. 6, pp. 860-865.
15. Wirtz S., Neufert C., Weigmann B., Neurath M.F. Chemically induced mouse models of intestinal inflammation. *Nat. Protoc.*, 2007, Vol. 2, no. 3, pp. 541-600.

Авторы:

Давыдова Е.В. — д.м.н., доцент, профессор кафедры патологической физиологии ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Челябинск, Россия

Осиков М.В. — д.м.н., профессор, заведующий кафедрой патологической физиологии ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Челябинск, Россия

Кайгородцева Н.В. — ассистент кафедры патологической физиологии ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Челябинск, Россия

Authors:

Davydova E.V., PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Professor, Department of Pathological Physiology, South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

Osikov M.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Pathological Physiology, South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

Kaigorodtseva N.V., Assistant Professor, Department of Pathological Physiology, South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

Поступила 05.01.2022
Отправлена на доработку 13.02.2022
Принята к печати 22.02.2022

Received 05.01.2022
Revision received 13.02.2022
Accepted 22.02.2022

МАКРОФАГИ В ЭПИКАРДИАЛЬНОЙ ЖИРОВОЙ ТКАНИ И СЫВОРОТОЧНЫЙ NT-proBNP У ПАЦИЕНТОВ СО СТАБИЛЬНОЙ ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ СЕРДЦА

Кологривова И.В., Суслова Т.Е., Кошельская О.А., Ребенкова М.С., Харитонов О.А., Дымбрылова О.Н., Андреев С.Л.

Научно-исследовательский институт кардиологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт кардиологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук», г. Томск, Россия

Резюме. Ишемическая болезнь сердца (ИБС) является хроническим воспалительным заболеванием, причем дисфункциональная эпикардальная жировая ткань выступает в роли важного источника воспаления. N-терминальный фрагмент мозгового натрийуретического пептида В-типа (NT-proBNP) является общепризнанным сердечно-сосудистым маркером кардиального происхождения. Причем в последнее время было показано, что провоспалительные стимулы также могут влиять на его секрецию.

Целью исследования стала оценка сывоточной концентрации NT-proBNP в сопоставлении с составом клеток иммунной системы в эпикардальной жировой ткани (ЭЖТ) и цитокиновым профилем у пациентов с ИБС.

В исследование вошли пациенты со стабильной ИБС и хронической сердечной недостаточностью II-III ФК по классификации Нью-Йоркской кардиологической ассоциации (NYHA) с показаниями для проведения операции аортокоронарного шунтирования (АКШ) (n = 10; в возрасте 59,5 (53,0-65,0) лет; 50% мужчины). Образцы ЭЖТ и подкожной жировой ткани (ПЖТ) получали в ходе планового аортокоронарного шунтирования (АКШ). Для исследования применяли иммуногистохимический метод окрашивания антителами к CD68, CD45, IL-1 β и TNF α . Для подсчета клеток использовали световую микроскопию. Подсчет клеток проводился в 10 полях зрения при увеличении 400. Перед проведением оперативного вмешательства у пациентов производили взятие венозной крови утром натощак. Кровь центрифугировали при 1500 g, с последующим алиquotированием образцов сывотки крови, которые хранились при температуре -40 °С. Концентрации NT-proBNP, IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF α оценивали в сывотке методом иммуноферментного анализа (ИФА).

Мы выявили увеличение продукции IL-1 β и TNF α в ЭЖТ в сравнении с ПЖТ. Уровень NT-proBNP превышал концентрацию 125 пг/мл у 4 пациентов и коррелировал с содержанием CD68⁺ макрофагов как в ЭЖТ, так и в ПЖТ ($r_s = 0,762$; $p = 0,010$ и $r_s = 0,835$; $p = 0,003$ соответственно). Концентрация NT-proBNP положительно коррелировала с количеством CD45⁺ лейкоцитов ($r_s = 0,799$; $p = 0,006$) и IL-1 β ⁺ клеток ($r_s = 0,705$; $p = 0,023$) исключительно в ЭЖТ. Среди сывоточных маркеров, NT-proBNP был отрицательно связан с уровнем глюкозы натощак ($r_s = -0,684$; $p = 0,029$), и положительно в сывоточной концентрации IL-6 ($r_s = 0,891$; $p = 0,001$).

Адрес для переписки:

Кологривова Ирина Вячеславовна
Научно-исследовательский институт кардиологии
634012, Россия, г. Томск, ул. Киевская, 111а.
Тел.: 8 (913) 105-38-69.
E-mail: ikologrivova@gmail.com

Address for correspondence:

Kologrivova Irina V.
Cardiology Research Institute, Tomsk NRMC
634012, Russian Federation, Tomsk, Kievskaya str., 111a.
Phone: 7 (913) 105-38-69.
E-mail: ikologrivova@gmail.com

Образец цитирования:

И.В. Кологривова, Т.Е. Суслова, О.А. Кошельская, М.С. Ребенкова, О.А. Харитонов, О.Н. Дымбрылова, С.Л. Андреев «Макрофаги в эпикардальной жировой ткани и сывоточный NT-proBNP у пациентов со стабильной ишемической болезнью сердца» // Медицинская иммунология, 2022. Т. 24, № 2. С. 389-394. doi: 10.15789/1563-0625-MIE-2456
© Кологривова И.В. и соавт., 2022

For citation:

I.V. Kologrivova, T.E. Suslova, O.A. Koshelskaya, M.S. Rebenkova, O.A. Kharitonova, O.N. Dymbrylova, S.L. Andreev "Macrophages in epicardial adipose tissue and serum NT-proBNP in patients with stable coronary artery disease", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2022, Vol. 24, no. 2, pp. 389-394. doi: 10.15789/1563-0625-MIE-2456
DOI: 10.15789/1563-0625-MIE-2456

Увеличение сывороточной концентрации NT-proBNP у пациентов с ИБС соответствует аккумуляции макрофагов в ЭЖТ, что ассоциируется с увеличением продукции IL-1 β в ЭЖТ и коррелирует с метаболическими параметрами.

Ключевые слова: макрофаги, эпикардальная жировая ткань, NT-proBNP, ишемическая болезнь сердца, воспаление

MACROPHAGES IN EPICARDIAL ADIPOSE TISSUE AND SERUM NT-proBNP IN PATIENTS WITH STABLE CORONARY ARTERY DISEASE

Kologrivova I.V., Suslova T.E., Koshelskaya O.A., Rebenkova M.S., Kharitonova O.A., Dymbrylova O.N., Andreev S.L.

Cardiology Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russian Federation

Abstract. Coronary artery disease (CAD) is widely considered a chronic inflammatory disorder, and dysfunction of epicardial adipose tissue could be an important source of the inflammation. Amino-terminal fragment of pro-B-type natriuretic peptide (NT-proBNP) is a known marker of cardiovascular disorders of cardiac origin. Recent studies show that inflammatory stimuli may influence its secretion. Our purpose was to evaluate NT-proBNP serum concentration in relation to immune cell ratios in epicardial adipose tissue (EAT), and cytokine levels in the patients with stable CAD.

Patients with stable CAD and heart failure classified into classes II–III, according to the New York Heart Association (NYHA) scale, scheduled for the coronary artery bypass graft (CABG) surgery, were recruited into the study ($n = 10$; 59.5 (53.0–65.0) y. o.; 50% males). The EAT and subcutaneous adipose tissue (SAT) specimens were harvested in the course of CABG surgery. Immunostaining with anti-CD68, anti-CD45, anti-IL-1 β and anti-TNF α monoclonal antibodies was performed to evaluate cell composition by differential counts *per* ten fields (400 magnification). Fasting venous blood was obtained from patients before CABG. Blood was centrifuged at 1500g, aliquots were collected and stored frozen at -40 °C until final analysis. Concentrations of NT-proBNP, IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF α were determined in serum samples by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

We have found increased production of IL-1 β and TNF α cytokines in EAT compared to SAT. Concentrations of NT-proBNP exceeded 125 pg/ml in 4 patients, and correlations between the CD68⁺ macrophage counts in both EAT and SAT samples ($r_s = 0.762$; $p = 0.010$ and $r_s = 0.835$; $p = 0.003$, respectively). NT-proBNP levels showed positive relations with CD45⁺ leukocyte counts ($r_s = 0.799$; $p = 0.006$), and with IL-1 β ⁺ cell numbers ($r_s = 0.705$; $p = 0.023$) in EAT samples only. As for the serum biomarkers, NT-proBNP levels showed negative correlation with fasting glucose levels ($r_s = -0.684$; $p = 0.029$), and positive correlation with serum IL-6 concentrations ($r_s = 0.891$; $p = 0.001$).

Increased serum concentrations of NT-proBNP in CAD patients correlate with accumulation of macrophages in EAT, which is associated with increased production of IL-1 β in EAT and correlates with some metabolic parameters.

Keywords: macrophages, epicardium, adipose tissue, NT-proBNP, coronary artery disease, inflammation

This work was completed within the framework of the fundamental research No. AAAA-A15-115123110026-3.

Introduction

Adipose tissue represents an important source of inflammation in cardiovascular patients. White adipose tissue produces a wide range of adipokines:

various cytokines, chemokines and hormones with the potential to regulate the development of inflammation. The balance between inflammatory and anti-inflammatory adipokines skews to the inflammatory side under the development of the dysfunction of adipose tissue observed during obesity. This in turn serves as a stimulus to the enrichment of the adipose tissue with the immune cells, both

of myeloid and lymphoid origin. An observed accumulation of leukocytes aggravates tissue specific and systemic insulin resistance even further [13].

Epicardial adipose tissue (EAT) is positioned in the close proximity to the coronary arteries and has a great potency to impact the heart functioning [8]. Infiltration of EAT with inflammatory cells (macrophages and CD8⁺T lymphocytes) increases in coronary artery disease (CAD) patients, while cellular composition of SAD remains unaffected [7].

The family of natriuretic peptides includes atrial natriuretic peptide (ANP), brain natriuretic peptide (BNP) and C-type natriuretic peptide (CNP), secreted from the cardiac atria, ventricles and vascular endothelium, respectively. All the natriuretic peptides are mainly involved in the regulation of work of renal system, increasing glomerular filtration and enhancing diuresis, as well as participate in redistribution of the fluid from the blood vessels into interstitial space. Natriuretic peptides have been proven to be important cardiovascular markers hence they allow to distinguish the presence of the heart failure and predict the incident cardiovascular events [10].

BNP is released from the tissue of cardiac ventricles in the equimolar quantities with more stable amino-terminal fragment of pro-B-type natriuretic peptide (NT-proBNP) during the pressure or volume overload of the heart [2]. According to the experimental and clinical data NT-proBNP possesses anti-inflammatory properties and increases in acute inflammatory conditions even in the absence of the heart failure and other cardiac disorders [4].

The data on the interconnections between NT-proBNP levels and EAT thickness and volume remain contradictory: the levels of NT-proBNP were directly related to the EAT thickness in patients with acute ischemic stroke and stable CAD [1], while obese heart failure (HF) with preserved ejection fraction (HFpEF) patients were characterized by the lower level of NT-proBNP compared to nonobese HFpEF and healthy individuals despite increased epicardial

fat thickness [12]. Currently there are no data whether NT-proBNP (even though being the most widely used cardiovascular marker) is interconnected to the level of inflammation in EAT.

The aim of the present study was evaluation of NT-proBNP concentration in relation to the immune cellular composition of EAT and cytokine background in patients with stable CAD.

Materials and methods

The study protocol was approved by the local Biomedical Ethics Committee of Cardiology Research Institute (protocol #146 from June 16, 2016). All procedures were performed in accordance with the Helsinki Declaration and principles of Good Clinical Practice (GCP) and Good Laboratory Practice (GLP).

We have enrolled 10 patients aged 50-68 years with stable CAD and heart failure New York Heart Association (NYHA) class II-III (50% males) who were scheduled for the coronary artery bypass graft (CABG) surgery. All the patients signed an informed consent to participate in the study. Clinical characteristics of patients are represented in Table 1. Exclusion criteria from the study were as following: inflammatory processes of any localization; acute coronary event such as transitory ischemic attack, acute coronary syndrome, and acute myocardial infarction within 6 months before the study; obesity class III and higher (body mass index (BMI) > 35); severe comorbidity (hepatic failure, kidney failure, cancer of any localization); refusal to participate in the study.

Fasting samples of 10 ml of peripheral blood were obtained 2-3 days in advance of the scheduled CABG. Serum samples have been prepared via centrifugation of blood at 1000g for 15 minutes. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to determine concentration of the soluble cytokines and hormones in serum: NT-proBNP (Biomedica, Germany),

TABLE 1. CLINICAL CHARACTERISTICS AND LABORATORY MEASUREMENTS OF THE PATIENTS

Parameters	
Gender (m/f)	5/5
Age, years	59.5 (53.0-65.0)
Left ventricular ejection fraction < 40% / < 50% / normal, n (%)	1 (10%) / 2 (20%) / 7 (70%)
Body mass index, kg/m ²	29.2 (27.4-31.2)
Waist circumference, cm	97.0 (93.0-103.0)
Epicardial adipose tissue thickness, mm	5.6 (5.0-7.4)
Fasting glucose, mM	6.1 (5.7-6.7)
Fasting insulin, μU/ml	11.9 (7.5-20.7)
HbA1c, %	6.4 (6.0-8.3)

TABLE 2. COUNTS OF ACCUMULATING CELLS IN SUBCUTANEOUS AND EPICARDIAL ADIPOSE TISSUE DEPOTS

Cell phenotype	Subcutaneous adipose tissue	Epicardial adipose tissue	p
CD45 ⁺ leukocytes, number of cells	8.0 (6.0-14.0)	6.0 (3.0-18.0)	0.959
CD68 ⁺ macrophages, number of cells	10.0 (4.0-14.0)	15.0 (10.0-28.0)	0.285
IL-1 β ⁺ cells, number of cells	1.0 (0.0-2.0)	6.0 (3.0-10.0)	0.005
IL-1 β in tissue, scores	0 (0-0)	1.0 (1.0-2.0)	0.012
TNF ⁺ cells, number of cells	9.0 (6.0-14.0)	14.5 (8.0-17.0)	0.047
TNF in tissue, scores	2.0 (1.0-2.0)	2.0 (1.0-2.0)	0.686

IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF α , high-sensitive C-reactive protein (hsCRP) (Vector-BEST, Russia).

In total 1 cm³ of EAT and subcutaneous adipose tissue (SAT) was harvested in the course of the scheduled CABG surgery. Samples of SAT and EAT were obtained before connecting of heart-lung machine using sharp scalpel without electrocoagulation. Biopsies were fixed in 10% buffered formalin for 24 hours, were subjected to standard histological wiring, embedded in paraffin, sectioned into 3–5 μ m thick slices and applied on Polysine slides (Thermo Scientific, USA). Selected sections were subjected to immunohistochemistry. Obtained specimens were deparaffinized in xylols and alcohols and washed in distilled water. Antigens unmasking was performed in moist incubation chamber at 97°C in Tris-EDTA buffer (pH = 9.0) for 20 minutes. Slides after unmasking were cooled down up to the room temperature and washed twice in phosphate buffer saline (PBS). Each section was circled with paraffin marker. Endogenous peroxidase blocking solution was applied for 10 minutes followed by washing in PBS 2 times. Protein block was applied for 10 minutes followed by washing in PBS 2 times. Murine anti-human monoclonal antibodies against CD68 (Aglient Dako, Denmark), CD45 (Cell marque, Germany), IL-1 β (Abcam, UK) and TNF α (Gene Tex, USA) were applied for 30 minutes followed by washing in PBS 3 times. Horse-reddish peroxidase was added for 15 minutes and washed in PBS 4 times. DAB solution was added for 40 seconds and washed in PBS 4 times. Sections were counterstained with hematoxylin, rehydrated and mounted under the cover glass. Light microscopy

(microscope Axio Imager M2, Zeiss, Germany) was used for analysis. Number of cells was quantified from ten 400 magnified fields. Tissue production of cytokines was evaluated according to the staining intensity and staining area: score 1 corresponded to low staining intensity and staining area up to 30%; score 2 corresponded to medium staining intensity and staining area above 30% but below 60%; score 3 corresponded to intense continuous cytokine staining.

Statistical analysis was performed in Statistica 13.0 software (StatSoft Inc., USA). Shapiro–Wilk criterion was used to assess the normality of the distribution of the data. Continuous variables were presented as median and interquartile range (Me (Q_{0.25}–Q_{0.75})). Statistical comparisons were performed using Mann–Whitney test. Calculation of means in sub-groups was performed by k-means cluster analysis. Associations between parameters were evaluated using Spearman correlation coefficient. All statistical hypotheses were accepted according to the achieved significance level $p < 0.05$.

Results and discussion

Numbers of CD45⁺ cells and CD68⁺ macrophages did not differ between SAT and EAT (Table 2). However, we have revealed increased accumulation of IL-1 β ⁺ and TNF⁺ cells in EAT, compared to SAT in recruited patients, as well as increased scores of tissue expression of IL-1 β in EAT (Table 2).

Concentrations of NT-proBNP, serum cytokines and chemokines in the total group of patients are represented in Table 3. Concentrations of NT-proBNP exceeded cut-off value set for the diagnosis of chronic heart failure (125 pg/ml) in 4 patients according to the recent National guidelines [11].

We have revealed positive correlations between serum concentrations of NT-proBNP and counts of CD68⁺ macrophages both in EAT and SAT ($r_s = 0.762$; $p = 0.010$ and $r_s = 0.835$; $p = 0.003$, respectively). NT-proBNP was positively related to the counts of CD45⁺ leukocytes ($r_s = 0.799$; $p = 0.006$) and numbers of IL-1 β ⁺ cells ($r_s = 0.705$; $p = 0.023$) only in EAT. As for the serum biomarkers, NT-proBNP was negatively related to the level of fasting glucose

TABLE 3. LEVELS OF NT-proBNP, ADIPOKINES AND CYTOKINES IN BLOOD OF RECRUITED PATIENTS

Parameters	
NT-proBNP, pg/ml	84.48 (34.95-166.72)
IL-1 β , pg/ml	0.51 (0.36-0.79)
IL-6, pg/ml	1.94 (0.83-3.18)
TNF α , pg/ml	0.35 (0.28-0.38)
IL-10, pg/ml	3.18 (2.39-3.58)

($r_s = -0.684$; $p = 0.029$) and positively correlated with the serum IL-6 concentrations ($r_s = 0.891$; $p = 0.001$).

The involvement of BNP into pathogenesis of inflammation has been confirmed in multiple studies. Thus, patients with rheumatoid arthritis presented with elevated levels of NT-proBNP even in the absence of the heart failure [14]. Elevation of NT-proBNP was associated with increased mortality in SARS-CoV-2 patients irrespective of the heart failure status [3].

Weak-to-moderate correlation between NT-proBNP and macrophage migration inhibitory factor (MIF) in HFpEF patients demonstrated in the study of Luedike P. et al. (2018) allows to presume that associations observed in our study may be due to the changes in EAT macrophages' chemotaxis [9].

IL-1 β may be regarded as a potential cytokine involved in regulation of inflammation in epicardial fat, as we have observed elevation of it in EAT and concentrations of IL-1 β correlated with NT-proBNP levels. According to the results of van Tassel B.W. et al. (2018) daily injections of interleukin-1 receptor antagonist to patients with heart failure with preserved ejection fraction was associated with decrease of high-sensitivity CRP and NT-proBNP levels in 4 weeks [15].

Metabolic effects of NT-proBNP have also been appreciated recently. Thus, increase of NT-proBNP levels was associated with the reduction of the risk

of diabetes development and HDL, triglycerides and adiponectin were identified as the putative mediators of this effect. Receptors to NPs are found in adipose tissue and they may stimulate lipolysis, promote browning of adipocytes and affect adipokines' release upon binding [5]. According to Heinisch B.B. et al. (2012) BNP has a potency to induce redistribution of glucose in human organism in insulin-independent manner lowering its concentration in the blood [6]. This may explain the inverse correlation between NT-proBNP and fasting glucose observed in our study. Further studies targeting changes of NT-proBNP in diabetes in respect to the development of inflammation in EAT are required.

The limitations of the study include low number of patients being recruited and its descriptive design.

Conclusion

Thus in our study we have shown for the first time, that increased concentrations of NT-proBNP in serum of CAD patients correlate with the accumulation of macrophages in epicardial adipose tissue, which is associated with increased production of proinflammatory cytokine IL-1 β and changes of metabolic parameters. Further prospective studies are required to identify the potential consequences of increased NT-proBNP production for the development of cardiovascular and total undesirable events in these patients.

References

1. Altun I., Unal Y., Basaran O., Akin F., Emir G.K., Kutlu G., Biteker M. Increased epicardial fat thickness correlates with aortic stiffness and N-terminal pro-brain natriuretic peptide levels in acute ischemic stroke patients. *Tex. Heart Inst. J.*, 2016, Vol. 43, no. 3, pp. 220-226.
2. Arjamaa O. Physiology of natriuretic peptides: The volume overload hypothesis revisited. *World J. Cardiol.*, 2014, Vol. 6, no. 1, pp. 4-7.
3. Caro-Codón J., Rey J.R., Buño A., Iniesta A.M., Rosillo S.O., Castrejon-Castrejon S., Rodriguez-Sotelo L., Martinez L.A., Marco I., Merino C., Martin-Polo L., Garcia-Vecas J.M., Martinez-Cossiani M., Gonzalez-Valle L., Herrero A., López-de-Sa E., Merino J.L. Characterization of NT-proBNP in a large cohort of COVID-19 patients. *Eur. J. Heart Fail.*, 2021, Vol. 23, pp. 456-464.
4. Fish-Trotter H., Ferguson J.F., Patel N., Arora P., Allen N.B., Bachmann K.N., Daniels L.B., Reilly M.P., Lima J.A.C., Wang T.J., Gupta D.K. Inflammation and circulating natriuretic peptide levels. *Circ. Heart Fail.*, 2020, Vol. 13, no. 7, e006570. doi: 10.1161/CIRCHEARTFAILURE.119.006570.
5. Gruden G., Landi A., Bruno G. Natriuretic peptides, heart, and adipose tissue: new findings and future developments for diabetes research. *Diabetes Care*, 2014, Vol. 37, no. 11, pp. 2899-2908.
6. Heinisch B.B., Vila G., Resl M., Riedl M., Dieplinger B., Mueller T., Luger A., Pacini G., Clodi M. B-type natriuretic peptide (BNP) affects the initial response to intravenous glucose: a randomised placebo-controlled cross-over study in healthy men. *Diabetologia*, 2012, Vol. 55, no. 5, pp. 1400-1405.
7. Hirata Y., Kurobe H., Akaike M., Chikugo F., Hori T., Bando Y., Nishio C., Higashida M., Nakaya Y., Kitagawa T., Sata M. Enhanced inflammation in epicardial fat in patients with coronary artery disease. *Int. Heart J.*, 2011, Vol. 52, no. 3, pp. 139-142.
8. Iacobellis G., Corradi D., Sharma A.M. Epicardial adipose tissue: anatomic, biomolecular and clinical relationships with the heart. *Nat. Clin. Pract. Cardiovasc. Med.*, 2005, Vol. 2, no. 10, pp. 536-543.
9. Luedike P., Alatzides G., Papathanasiou M., Heisler M., Pohl J., Lehmann N., Rassaf T. Predictive potential of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in patients with heart failure with preserved ejection fraction (HFpEF). *Eur. J. Med. Res.*, 2018, Vol. 23, no. 1, 22. doi: 10.1186/s40001-018-0321-1.

10. Madamanchi C., Alhosaini H., Sumida A., Runge M.S. Obesity and natriuretic peptides, BNP and NT-proBNP: mechanisms and diagnostic implications for heart failure. *Int. J. Cardiol.*, 2014, Vol. 176, no. 3, pp. 611-617.
11. National Guidelines OSSN, RCO and RNMOT for the diagnosis and treatment of chronic heart failure (fourth revision). *Journal of Cardiac Failure*, 2013, Vol. 81, no. 7, pp. 379-472. (In Russ.)
12. Obokata M., Reddy Y.N.V., Pislaru S.V., Melenovsky V., Borlaug B.A. Evidence supporting the existence of a distinct obese phenotype of heart failure with preserved ejection fraction. *Circulation*, 2017, Vol. 136, no. 1, pp. 6-19.
13. Park Y.M., Myers M., Vieira-Potter V.J. Adipose tissue inflammation and metabolic dysfunction: role of exercise. *Mo Med.*, 2014, Vol. 111, no. 1, pp. 65-72.
14. Solus J., Chung C.P., Oeser A., Avalos I., Gebretsadik T., Shintani A., Raggi P., Sokka T., Pincus T., Stein C.M. Amino-terminal fragment of the prohormone brain-type natriuretic peptide in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*, 2008, Vol. 58, no. 9, pp. 2662-2669.
15. van Tassel B.W., Trankle C.R., Canada J.M., Carbone S., Buckley L., Kadariya D., del Buono M.G., Billingsley H., Wohlford G., Viscusi M., Oddi-Erdle C., Abouzaki N.A., Dixon D., Biondi-Zoccai G., Arena R., Abbate A. IL-1 blockade in patients with heart failure with preserved ejection fraction. Results from DHART2. *Circ. Heart Fail.*, 2018, Vol. 11, no. 8, e005036. doi:10.1161/CIRCHEARTFAILURE.118.005036.

Авторы:

Кологривова И.В. — к.м.н., научный сотрудник отделения клинической лабораторной диагностики ФГБНУ «Научно-исследовательский институт кардиологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук», г. Томск, Россия

Суслова Т.Е. — к.м.н., руководитель отделения клинической лабораторной диагностики ФГБНУ «Научно-исследовательский институт кардиологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук», г. Томск, Россия

Кошельская О.А. — д.м.н., профессор, ведущий научный сотрудник отделения атеросклероза и хронической ишемической болезни сердца ФГБНУ «Научно-исследовательский институт кардиологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук», г. Томск, Россия

Ребенкова М.С. — младший научный сотрудник лаборатории молекулярно-клеточной патологии и генодиагностики ФГБНУ «Научно-исследовательский институт кардиологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук», г. Томск, Россия

Харитонов О.А. — младший научный сотрудник отделения атеросклероза и хронической ишемической болезни сердца ФГБНУ «Научно-исследовательский институт кардиологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук», г. Томск, Россия

Дымбрылова О.Н. — к.м.н., младший научный сотрудник отделения клинической лабораторной диагностики ФГБНУ «Научно-исследовательский институт кардиологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук», г. Томск, Россия

Андреев С.Л. — к.м.н., старший научный сотрудник отделения сердечно-сосудистой хирургии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт кардиологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук», г. Томск, Россия

Authors:

Kologrivova I.V., PhD (Medicine), Research Associate, Department of Clinical Laboratory Diagnostics, Cardiology Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russian Federation

Suslova T.E., PhD (Medicine), Head, Department of Clinical Laboratory Diagnostics, Cardiology Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russian Federation

Koshelskaya O.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Leading Research Associate, Department of Atherosclerosis and Coronary Artery Disease, Cardiology Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russian Federation

Rebenkova M.S., Junior Research Associate, Laboratory of Molecular and Cellular Pathology and Genetic Testing, Cardiology Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russian Federation

Kharitonova O.A., Junior Research Associate, Department of Atherosclerosis and Coronary Artery Disease, Cardiology Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russian Federation

Dymbrylova O.N., PhD (Medicine), Junior Research Associate, Department of Clinical Laboratory Diagnostics, Cardiology Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russian Federation

Andreev S.L., PhD (Medicine), Senior Research Associate, Department of Cardiovascular Surgery, Cardiology Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russian Federation

МИКРОЦИРКУЛЯТОРНЫЕ И ВЕГЕТОСОСУДИСТЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ У ДЕТЕЙ С АЛЛЕРГИЧЕСКИМ РИНИТОМ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СРЕДЫ ПРОЖИВАНИЯ

Бережанский П.В.^{1,2}, Татаурщикова Н.С.¹

¹ ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», Москва, Россия

² ГБУЗ МО «Одинцовская областная больница», г. Одинцово, Московская обл., Россия

Резюме. В последнее время актуальность изучения влияния экологической составляющей среды на формирование общественного здоровья детского населения возрастает [1, 12, 20].

В последние десятилетия отмечается бурный рост аллергических заболеваний, в том числе и аллергического ринита среди детского населения. Большое количество исследований связывают увеличения числа аллергических заболеваний с влиянием окружающей среды, с техногенным развитием и урбанизацией [4].

Аллергический ринит (АР) представляет одну из наиболее актуальных проблем аллергологии и иммунологии [2]. АР является одной из наиболее распространенных хронических патологий у детей [6, 21].

Так, установлено, что патогенез АР представляет собой сложный механизм, который не ограничивается сугубо аллергической реакцией и воспалительным процессом в области носа. Он включает в себя сложные механизмы нейрогенного воспаления с участием основных нейропептидов и нейромедиаторов, которые находятся в тесной связи с состоянием эндокринной, иммунной систем человека, и во многом определяется состоянием слизистых оболочек носа и дыхательных путей в целом. На патогенез АР в первую очередь оказывает воздействие состояние микроциркуляторного русла слизистой оболочки, а также качественные и количественные характеристики микробиоценоза носовой полости, носо- и ротоглотки, верхних и нижних дыхательных путей. Все эти параметры напрямую определяются нейровегетативными механизмами [5, 7, 9, 16].

Важное место в патогенезе развития аллергических заболеваний занимают изменения в системе микроциркуляции, с участием которых реализуются все клинические проявления. Нарушения микроциркуляции играют важную инициально-триггерную роль в патогенезе аллергических ринитов.

Вегетативная нервная система обеспечивает связь организма с окружающей и внутренней средой, регулируя обмен веществ и функции органов и тканей в соответствии с изменениями этой среды, она также обеспечивает интеграцию всех органов в единое целое, являясь одной из главных адаптационных систем организма [13].

Так как во главе регуляции функционирования организма и гомеостаза стоит вегетативная нервная система, объединяющая отдельные патогенетические звенья развития заболеваний и обуславливающая структурное и функциональное единство [3, 19]. Механизм регуляции реализуется нервно-рефлекторным путем с помощью различных нейрогуморальных факторов, сущность которых изучена в экспериментальных условиях и на сегодняшний день не подвергается сомнению [8].

Ключевые слова: аллергический ринит, урбанизация, вегетативная нервная система, микроциркуляция, капилляроскопия, мегаполис

Адрес для переписки:

Бережанский Павел Вячеславович
ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов»
117198, Россия, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 6.
Тел.: 8 (915) 145-50-13.
E-mail: p.berezhanskiy@mail.ru

Address for correspondence:

Berezhansky Pavel V.
Peoples' Friendship University of Russia
117198, Russian Federation, Moscow,
Miklukho-Maclay str., 6.
Phone: 7 (915) 145-50-13.
E-mail: p.berezhanskiy@mail.ru

Образец цитирования:

П.В. Бережанский, Н.С. Татаурщикова
«Микроциркуляторные и вегетососудистые изменения
у детей с аллергическим ринитом в зависимости от
среды проживания» // Медицинская иммунология, 2022.
Т. 24, № 2. С. 395-400.
doi: 10.15789/1563-0625-EDM-2200
© Бережанский П.В., Татаурщикова Н.С., 2022

For citation:

P.V. Berezhansky, N.S. Tataurschikova "Environment-
dependent microcirculatory and autonomic neurovascular
changes in the children with allergic rhinitis", Medical
Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2022,
Vol. 24, no. 2, pp. 395-400.
doi: 10.15789/1563-0625-EDM-2200
DOI: 10.15789/1563-0625-EDM-2200

ENVIRONMENT-DEPENDENT MICROCIRCULATORY AND AUTONOMIC NEUROVASCULAR CHANGES IN THE CHILDREN WITH ALLERGIC RHINITIS

Berezhansky P.V.^{a, b}, Tataurschikova N.S.^a

^a Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russian Federation

^b Odintsovo Regional Hospital, Odintsovo, Moscow Region, Russian Federation

Abstract. Recently, the studies of environmental effects upon public health of children become quite relevant [1, 12, 20]. Over last decades, there is a rapid increase in allergic diseases, including allergic rhinitis, among the child population. A large number of studies connect this increment in pediatric allergies with influence of environment, technogenic development and urbanization [4]. Allergic rhinitis (AR) is one of the most pressing problems in allergology and immunology [2], being among the most common chronic disorders in children [6, 21]. Thus, it was found that the pathogenesis of AR is a complex mechanism that is not limited to a purely allergic reaction and inflammation in the nasal region. It includes complex mechanisms of neurogenic inflammation under participation of the main neuropeptides and neurotransmitters, which are closely related to the individual condition of endocrine and immune systems, being largely determined by the state of mucous membranes of the nasal cavity and respiratory tract in general. The pathogenesis of AR is primarily influenced by the state of microvasculature of the mucous membrane, as well as distinct qualitative and quantitative characteristics of microbiocenosis of the nasal cavity, nasopharynx and oropharynx, upper and lower respiratory tract. All these parameters are directly determined by neurovegetative mechanisms [5, 7, 9, 16].

An important place in the pathogenesis of the development of allergic diseases belongs to changes of the microcirculation system which is involved into all the clinical manifestations observed. The microcirculation disorders play an important initial triggering role in pathogenesis of allergic rhinitis. Likewise, the autonomic nervous system is responsible for setting links between the body, ambient and internal environment *via* regulation of metabolism, functioning of organs and tissues based on changes in this environment; it also provides integration of all organs into a single entity, acting as one of the main adaptive systems in human body [13].

Therefore, the autonomic nervous system regulates the body and homeostasis by unifying the separate pathogenetic links of disease progression and setting basis for structural and functional unity [3, 19]. This regulatory mechanism is implemented *via* nerves and reflexes by different neurohumoral factors. Their nature has been established under experimental conditions and is beyond doubt to date [8].

Keywords: allergic rhinitis, urbanization, autonomic nervous system, microcirculation, capillaroscopy, megapolis

Introduction

According to the environmental approach, a long-term impact on the environment resulted in the creation of a new (anthropogenic, urban) ecosystem that has a diverse impact on a growing body, the consequences of such impact are quite difficult to visualize and assess [11]. Recently, many researchers report an increase in number and change in the ratio of risk factors for health deterioration. The impact of these factors depends on the body's adaptive capacities [1].

The significant difference between the conditions of life for children in megapolises and a rural area has a direct impact on the children's organism features [17]. A study of changes in the functional state of children according to the degree of regulatory systems tension

in a megapolis or rural environment will allow to identify functional disorders and diseases in time [9].

The heart rate variability analysis is used to evaluate the body's adaptation to changing environment conditions, it allows to describe the activity of different subsystems of the autonomic nervous system through their influence on the cardiac pacer functions [14]. The nervous system ensures that cells, tissues, organs, and organ systems are integrated into a single whole. It acts as a link connecting all living systems to the environment and ensures their adaptation to its constantly changing components by regulating life activities.

The organism's adaptive activity indicator is the blood circulation system, both central and peripheral. Scholars note that vegetative reactions are

non-specific features of regulatory processes, also in the microcirculatory bloodstream system. The microcirculation system is an important pathogenetic link in the development and progression of many diseases. That is why it is very promising to study methods for objective appraisal of its changes.

The knowledge on vegetative and microcirculatory homeostasis for children living in megapolises and rural areas is scarce and contradictory compared to the findings of the heart rate variability analysis. Meanwhile, the intensity of urbanization and anthropogenic load dictate the relevance of studying their impact on children's health.

Materials and methods

120 children with allergic rhinitis in the age of 7 to 11 have been examined in the outpatient clinic. All children have undergone the condition of the microcirculatory bloodstream has been examined by computer-aided nail bed capillaroscopy in course of which some parameters such as length of capillaries arterial and venular parts, inequalities of arterial and venular capillary parts caliber; distance between capillaries, diameter of arterial and venular parts of capillaries; distance between arterial and venular parts of capillaries; perivascular zone length have been analyzed. The autonomic nervous system conditions were assessed following the results of heart rate variability (HRV) within 3 minutes by means of Cardiovisor-6C equipment complex (Medical Computer Systems LLC, Russia). In course of HRV study, the standard deviation of NN intervals mean value (SDNN), root mean square of successive differences (RMSSD), regulatory systems stress index (SI, Baevsky's index), centralization index (IC), root mean square deviation of NN intervals duration (PNN50), number of interval values corresponding to the modal values (AMo), two frequency ranges: HF (high frequency component), LF (low frequency component), and their ratios have been calculated.

The study involved 2 groups of patients: the main group included 60 children from a megapolis away from massive green areas, and the comparison group comprised 60 children from rural areas. The results have been processed in SPSS 14.0 software (SPSS Lab, USA).

Results and discussion

In order to comprehensively assess children's health, generally accepted criteria were used [18]. According to the life history, almost all children in the main group (81%) experienced an increase in the ARI cases in March-April; in the comparison group, number of ARI cases was approximately the same

and had no seasonal nature. In the main group, the respiratory disease index amounted to 0.44 ± 0.16 , in the comparison group to 0.3 ± 0.14 ; $p < 0.05$. The children living in megapolises had a later age of ARI onset – 7.9 ± 1.2 months than those living in rural areas 5.8 ± 1.2 months) ($p < 0.05$).

The main group, 21.6% of patients ($n = 13$) demonstrated an increase in body temperature (above 38.5°C) when suffered ARI, 51.6% ($n = 31$) of the study group (sometimes even 26.8% ($n = 16$)) showed no increase in body temperature. For the comparison group: 41.6% ($n = 25$), 53.3% ($n = 32$), and 5.1% ($n = 3$) of children respectively ($p < 0.05$). There was a high degree of domestic and social history burden in the main group of children ($p < 0.05$).

We looked at heart rate variations as at the result of the activity of different parts of the autonomic nervous system related to the functioning of neurohormonal regulation mechanisms to support homeostasis and different functional systems development under environmental influence.

The HRV analysis revealed that children from urban areas suffer from a regulatory systems deficiency or exhaustion. The analysis of the heart rate at rest shows that the values of SDNN, a parameter that reflects the overall variability of heart rate, were higher in the main group than in the comparison group. The same trend was peculiar to the main group in terms of RMSSD parameters that represent high-frequency heart rhythm components, which exceeded the corresponding index by 1.5 times in the comparison group.

The children from the main group showed a decrease in AMo (24.9 ± 7.1) and an increase in the variation range mean value to 0.36 ± 0.035 sec. This indicates a raise of the autonomic nervous system sympathetic effect on children's regulatory processes. In the comparison group the variation range mean value amounted to 0.3 ± 0.07 sec, and AMo to 34.5 ± 8.3 .

The stress index was within normal limits in all groups, but children living in cities and towns had a stress index two times higher than children living in rural areas, 226.5 ± 54.3 and 134.1 ± 44.7 , respectively. The centralization index correlating to the central regulation mechanisms stress in course of adaptation was 4 times above the norm in the main group – 10.8 ± 2.1 mainly because of the activation of the ANS sympathetic division, while in the comparison group this index was within normal limits – 2.2 ± 0.9 .

All children from the main group demonstrated a slight decrease in the low-frequency (LF) spectrum and an increase in the high-frequency (HF) component $p > 0.05$ (Fig. 1, see 3rd page of cover). The

same trend was registered when determining the LF/HF ratio: 3.8 ± 0.7 in the main group, 4.4 ± 0.5 , $p > 0.05$ in the comparison group (Fig. 2, see 3rd page of cover).

Positive correlations between IS and residence in the vicinity of industrial enterprises and highways ($r = 0.69$), between LF/HF and viral infections rate ($r = 0.63$), and negative correlation between IS and body temperature increase ($r = -0.6$) have been detected.

Today, it is widely known that microvascular regulation disorder affects inflammatory processes in the body. Due to this, microcirculatory changes of vascular kind genesis indirectly reflect adaptive reactions and act as critical factors that cause pathophysiological disorders leading to frequent ARIs for children living in different conditions.

In contrast to the comparison group, the main group of children showed changes in the microcirculatory bloodstream represented by a minor increase in the capillaries venular part diameter, 52.1 ± 5.9 and 46.8 ± 5.7 $p > 0.05$ respectively in comparison with the control group, while the main group had a reliably smaller arteriolar-to-venular ratio (AVR) indicating the ratio of parallel vessels diameters (0.28 ± 0.02 and 0.35 ± 0.03 respectively; $p < 0.05$). We believe that these changes are compensatory because of the high impact of the autonomic nervous system sympathetic division that reduces at the arterial part due to muscle spasm, increases biochemical active paraendothelial space and leads to perfusion disorders.

Positive correlations between AVR reduction and viral infections rate ($r = 0.72$), AVR and centralization index ($r = 0.72$), SDNN and venular part diameter in the capillaries ($r = 0.6$), negative correlation between stress index and body temperature increase at ARI ($r = 0.61$) have been revealed.

Children living in megalopolises far from massive green spaces tend to have a higher respiratory disease index and certain peculiarities of ARI clinical progression. This fact may serve as a reason for conducting a thorough examination of this group of children for early detection of vegetative dysfunction, before its clinical manifestation, creating a child's "vegetative passport" and determining basic immunological indicators for such children.

According to the findings, we see that children living in urban areas are prone to have changes in autonomic nervous system values and sympathetic division activation in comparison to children living in rural areas, most likely it derives from inadequate regulation in response to the complex impact of anthropogenic and urban factors.

It is known that the age groups examined by us have certain morphofunctional features on the one

hand, and on the other hand they are hypersensitive to anthropogenic stress, which is very high at this age, also, as per the heart rate variability data, they have low adaptation reserves. The obtained data show that children living in megapolises have an increased activity of the autonomic nervous system sympathetic division leading, in turn, to vegetative dysfunction and decreased adaptation, which reduces the body's adaptive capabilities and triggers a vicious circle in future. These findings fall in line with the conclusions of Mylnikova IV, Tsibulskaya IS, and others [15, 18].

Also, children living in urban areas display reactive tension in vegetative regulatory mechanisms and have an increased degree of centralization in heart rate control. This may be due to the complex influence of environmental factors on the child's body that results in nonproportional influence of different parts of the autonomic nervous system causing changes in both the microcirculatory bloodstream. In future, this should be studied for different age categories with the consideration of anthropogenic, socio-ecological, and urban stress impact on a child's organism.

Following the concept of vegetative-immunological adaptation to adverse factors, all groups of patients displayed $IFN\gamma$ within normal values, however children living in the urban environment had this indicator slightly decreased, at the same time the IgE content in blood serum was increased in this group. Perhaps, these changes are adaptive in respect to the urban pathology development under the functional stress mode and serve to prevent the compensatory mechanisms failure.

Most of the children in the main group have changes in the microcirculation system based on the autonomic nervous system influence on microcirculatory vessels arterial section, it also allows to adapt the body's reserve capacity to different surrounding, environmental and hygienic conditions, thereby normalizing the energy, nutrient metabolism, and increased immune response.

Conclusion

Children living in megapolises far from massive green spaces suffer from various adverse factors, inadequate to their nature and leading to adaptation mechanisms failure and disease onset. The fact that children from rural areas have not been exposed to these changes makes us believe that the factors affecting children in city environment are mostly of urban and anthropogenic origin.

The findings obtained give us grounds to say that children from megapolises have specific changes in the immune and autonomic nervous systems, and in the microcirculatory bloodstream. Urban children

experience reactive changes in their vegetative status toward greater dominance of central regulation mechanisms and a predominance of sympathetic tone, while rural children do not demonstrate an explicit sympathetic effect. This matter shall be considered in planning the personalized follow-up, treatment, and rehabilitation for such children. Also, it is important

to outline the urbanization factors with the greatest impact on a child's autonomic nervous system and come up with programs for their mitigation.

One of the important tasks that stands before a future research is to analyze gender indicators of children living under various conditions and examine different age groups of children.

References

1. Agadzhanian N.A. Problems of adaptation and human ecology. Human ecology: Main problems. 1988, pp. 93-103.
2. Akerlund A., Andersson M., Leflein J., Lildholdt T., Mygind N. Clinical trial design, nasal allergen challenge models, and considerations of relevance to pediatrics, nasal polyposis, and different classes of medication. *J Allergy Clin. Immunol.*, 2005, Vol. 115, no. 3, pp. 460-482.
3. Akselrod S. Components of heart rate variability. Basis studies. *Heart Rate Variability*, 1995, no. 2, pp. 147-163.
4. Baevsky R.M., Berseneva A.P. Assessment of adaptive capabilities and risk of disease progression. 1997, 235 p.
5. Brain S.D., Tippins J.R., Morris H.R., MacIntyre I., Williams T.J. Potent vasodilator activity of calcitonin gene-related peptide in human skin. *J. Invest. Dermatol.*, 1986, Vol. 87, no. 4, pp. 533-536.
6. Brozek J.L. Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA). Guidelines – Revision. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2017, no. 3, pp. 37-50.
7. Craig T.J., Sherkat A., Safae S. Congestion and sleep impairment in allergic rhinitis. *Curr. Allergy Asthma Rep.*, 2010, Vol. 10, no. 2, pp. 113-121.
8. Evans T.W., Rogers D.F., Aursudkij B., Chung K.F., Barnes P.J. Inflammatory mediators involved in antigen-induced airway microvascular leakage in guinea pigs. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 1988, Vol. 138, no. 2, pp. 395-399.
9. Filippo C.D., Paola M.D., Ramazzotti M., Albanese D., Pieraccini G., Banci E., Miglietta F., Cavalieri D., Lionetti P. Diet, environments, and gut microbiota. A preliminary investigation in children living in rural and urban Burkina Faso and Italy. *Front. Microbiol.*, 2017, Vol. 8, 1979. doi: 10.3389/fmicb.2017.01979.
10. Gomes E.L.F.D., Costa D., Germano S.M., Borges P.V., Sampaio L.M.M. Effects of CPAP on clinical variables and autonomic modulation in children during an asthma attack. *Respir. Physiol. Neurobiol.*, 2013, Vol. 188, no. 1, pp. 66-70.
11. Laborde A., Tomasina F., Bianchi F., Bruné M.N., Buka I., Comba P., Corra L., Cori L., Duffert C.M., Harari R., Iavarone I., McDiarmid M.A., Gray K.A., Sly P.D., Soares A., Suk W.A., Landrigan F.J. Children's health in Latin America: the influence of environmental exposures. *Environ. Health Perspect.*, 2015, Vol. 123, no. 3, pp. 201-209.
12. Mudway I.S., Dundas I., Wood H.E., Marlin N., Jamaludin J.B., Bremner S.A., Cross L., Grieve A., Nanzer A., Barratt B.M., Beevers S., Dajnak D., Fuller G.W., Font A., Colligan G., Sheikh A., Walton R., Grigg J., Kelly F.J., Lee T.H., Griffiths C.J. Impact of London's low emission zone on air quality and children's respiratory health: a sequential annual cross-sectional study. *Lancet Public Health*, 2019, Vol. 4, no. 1, pp. e28-e40.
13. Mulkey S.B., Plessis A.J. Autonomic nervous system development and its impact on neuropsychiatric outcome. *Pediatr. Res.*, 2019, Vol. 85, no. 2, pp. 120-126.
14. Muravyov A.V., Yakusevich V.V., Zaitsev L.P., Muravyov A.A. Hemorheology: development prospects. *Regional Blood Circulation and Microcirculation*, 2007, no. 2 (22), pp. 4-17. (In Russ.)
15. Mylnikova I.V., Efimova N.V. Comparative assessment of the functional state of city and village adolescents in the Irkutsk region. *Advances in Modern Natural Science*, 2015, no. 3, pp. 60-64. (In Russ.)
16. Ortiz M., Brinkhaus B., Enck P., Musial F., Zimmermann-Viehoff F. Autonomic function in seasonal allergic rhinitis and acupuncture – an experimental pilot study within a randomized trial. *Forsch. Komplementmed.*, 2015, Vol. 22, no. 2, pp. 85-92.
17. Rad M., Shahravan A., Haghdooost A.A. Effective factors on oral health behaviors of 12-year-old children in cities and villages of Iran: a path analysis. *J. Dent. (Shiraz)*, 2018, Vol. 19, no. 3, pp. 225-231.
18. Tsibulskaya I.S., Tsibulskiy V.B., Leonov S.A., Nazimova E.R. Health of children in cities and villages in the Russian Federation. *Social Aspects of Public Health*, 2014, pp. 1-20. (In Russ.)

19. Wiernsperger N., Rapin J.R. Microvascular diseases: is a new era coming? *Cardiovasc. Hematol. Agents Med. Chem.*, 2012, Vol. 10, no. 2, pp. 167-183.
20. Vanaken G.J., Danckaerts M. Impact of green space exposure on children's and adolescents' mental health: a systematic review. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 2018, Vol. 15, no. 12, 2668. doi: 10.3390/ijerph15122668.
21. Zhang G., Zhang D., Shi W., Sun P., Lin P. The impact of FOXP3 polymorphism on the risk of allergic rhinitis: a meta-analysis. *Ann. Hum. Genet.*, 2017, Vol. 81, no. 6, pp. 284-291.

Авторы:

Бережанский П.В. — к.м.н., ассистент кафедры медико-социальной адаптологии ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», Москва; врач-педиатр ГБУЗ МО «Одинцовская областная больница», г. Одинцово, Московская обл., Россия

Татаурищикова Н.С. — д.м.н., профессор, заведующая кафедрой медико-социальной адаптологии ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», Москва, Россия

Authors:

Berezhansky P.V., PhD (Medicine), Assistant Professor, Department of Medical and Social Adaptology, Russian University of the People Friendship, Moscow; Pediatrician, Odintsovo Regional Hospital, Odintsovo, Moscow Region, Russian Federation

Tataurschikova N.S., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Medical and Social Adaptology, Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russian Federation

Поступила 07.02.2021
Принята к печати 07.11.2021

Received 07.02.2021
Accepted 07.11.2021

ДИНАМИКА УРОВНЯ ХЕМОКИНА ENA-78/CXCL5 В СЫВОРОТКЕ КРОВИ И КОЖНОМ ЭКССУДАТЕ У ПАЦИЕНТОВ С АТОПИЧЕСКИМ ДЕРМАТИТОМ

Кибалина И.В., Цыбиков Н.Н., Фефелова Е.В.

ФГБОУ ВО «Читинская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения РФ,
г. Чита, Россия

Резюме. В современных научных исследованиях патогенеза atopического дерматита мало данных о динамике БАВ непосредственно в очаге поражения. На поверхности кожного покрова при atopическом дерматите высока персистенция микроорганизмов, однако патофизиологическая роль ENA-78/CXCL5 в развитии atopического дерматита до сих пор не изучена. Известно, что синтез ENA-78/CXCL5 осуществляется эндотелиоцитами, кератиноцитами, эозинофилами, фибробластами для активации миграции нейтрофилов, особенно под влиянием ЛПС микроорганизмов. Цель настоящего исследования заключалась в изучении динамики уровня хемокина ENA-78/CXCL5 в сыворотке крови и в кожном экссудате у пациентов с atopическим дерматитом, а также в определении патофизиологической роли хемокина в патогенезе дерматоза.

Под наблюдением находилось 80 пациентов с ограниченной и распространенной формами atopического дерматита и 15 добровольцев. Изучение динамики уровня хемокина ENA-78/CXCL5 осуществлялось в сыворотке крови и в кожном экссудате. Забор крови для исследования проводился в период обострения и ремиссии. Забор кожного экссудата у пациентов осуществлялся в период обострения с помощью одноразового инсулинового шприца и одноразовой иглы диаметром 20G, у здоровых добровольцев кожный экссудат получали методом «кожного окна» согласно медицинской технологии В.В. Климова и соавторов «Способ оценки минимальной воспалительной активности кожи при atopическом дерматите в стадии ремиссии». Исследование проводилось методом проточной цитофлуориметрии с применением панели The LEGEND plex TM Human Proinflammatory Chemokine Panel (США) в соответствии с протоколом производителя.

У подростков с atopическим дерматитом концентрация хемокина ENA-78/CXCL5 в сыворотке крови превышает показатели здоровых добровольцев, в период ремиссии уровень не достигает показателя в контрольной группе. У взрослых концентрация хемокина ENA-78/CXCL5 как при появлении симптомов, так и при их разрешении ниже уровня в группе контроля. Максимальные концентрации хемокина ENA-78/CXCL5 выявлены в кожном экссудате.

Базируясь на полученные данные динамики уровня хемокина ENA-78/CXCL5, можно предположить, что он является одним из звеньев патогенеза atopического дерматита, обуславливающего миграцию нейтрофилов и моноцитов в очаг поражения. Хемокин ENA-78/CXCL5 может являться маркером микробного звена патогенеза и клеточного повреждения при atopическом дерматите.

Ключевые слова: atopический дерматит, ENA-78/CXCL5, кожный экссудат, патогенез, нейтрофилы, воспаление

Адрес для переписки:

Кибалина Ирина Владимировна
ФГБОУ ВО «Читинская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения РФ
672000, Россия, Забайкальский край, г. Чита,
ул. Горького, 39а.
Тел.: 8 (924) 375-08-75.
E-mail: vilinia@rambler.ru

Address for correspondence:

Kibalina Irina V.
Chita State Medical Academy
672000, Russian Federation, Zabaikalsky Region,
Gorky str., 39a.
Phone: 7 (924) 375-08-75.
E-mail: vilinia@rambler.ru

Образец цитирования:

И.В. Кибалина, Н.Н. Цыбиков, Е.В. Фефелова
«Динамика уровня хемокина ENA-78/CXCL5
в сыворотке крови и кожном экссудате у пациентов
с atopическим дерматитом» // Медицинская
иммунология, 2022. Т. 24, № 2. С. 401-406.
doi: 10.15789/1563-0625-DOT-2461
© Кибалина И.В. и соавт., 2022

For citation:

I.V. Kibalina, N.N. Tsybikov, E.V. Fefelova
“Dynamics of the chemokine ENA-78/CXCL5 levels in blood serum and
skin exudate in patients with atopical dermatitis”, *Medical
Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2022,
Vol. 24, no. 2, pp. 401-406.
doi: 10.15789/1563-0625-DOT-2461
DOI: 10.15789/1563-0625-DOT-2461

DYNAMICS OF THE CHEMOKINE ENA-78/CXCL5 LEVELS IN BLOOD SERUM AND SKIN EXUDATE IN PATIENTS WITH ATOPIC DERMATITIS

Kibalina I.V., Tsybikov N.N., Fefelova E.V.

Chita State Medical Academy, Chita, Russian Federation

Abstract. Currently, there are only scarce data on dynamics of biologically active substances in the lesions associated with atopic dermatitis. Persistence of microorganisms in atopic dermatitis is high on the skin surface. However, pathophysiological significance of ENA-78/CXCL5 for development of atopic dermatitis was not studied so far. The ENA-78/CXCL5 is known to be produced by endotheliocytes, keratinocytes, eosinophils, fibroblasts to activate neutrophil migration, especially under the influence of LPS-containing microorganisms. The aim of this study was to evaluate the dynamics of ENA-78/CXCL5 chemokine levels in blood serum and skin exudates in the patients with atopic dermatitis, as well as to determine pathophysiological role of the chemokine in pathogenesis of dermatosis.

80 patients with limited and widespread forms of atopic dermatitis and 15 volunteers were under observation. The dynamics of ENA-78/CXCL5 levels was studied in blood sera and skin exudates. Blood samples for the study were drawn at the time periods of exacerbation and remission. Skin exudates were taken from the patients during the exacerbation period using disposable insulin syringes and 20-G disposable needles. In healthy volunteers, the skin exudate was obtained by the "skin window" technique as described by V.V. Klimov and co-authors "A method for assessing minimal inflammatory activity of skin in atopic dermatitis in remission". The cell analysis was conducted by flow cytometry using the LEGEND plex TM Human Proinflammatory Chemokine Panel (USA) according to the manufacturer's protocol.

Serum concentrations of chemokine ENA-78/CXCL5 in adolescents with atopic dermatitis, exceeded the range for healthy volunteers. During remission of dermatitis, the chemokine level did not reach the indices in the control group. In adults, the ENA-78/CXCL5 concentration, both at the onset of symptoms and upon their resolution, was below the control levels. Maximal concentrations of ENA-78/CXCL5 chemokine were detected in the skin exudates.

As based on our data on the dynamics of ENA-78/CXCL5 chemokine levels, it could be assumed that this substance may represent a sufficient link in pathogenesis of atopic dermatitis, by causing migration of neutrophils and monocytes to the affected area. The ENA-78/CXCL5 chemokine may be a marker of microbial pathogenesis and cellular damage in atopic dermatitis.

Keywords: atopic dermatitis, ENA-78/CXCL5, skin exudate, pathogenesis, neutrophils, inflammation

Введение

Атопический дерматит — хронический аллергический генетически детерминированный мультифакторный дерматоз, в основе патогенеза которого лежат иммунные нарушения. Хемокин ENA-78/CXCL5 синтезируется эндотелиоцитами, кератиноцитами, эозинофилами, фибробластами при активации их IL-1 α и TNF α [4]. ENA-78/CXCL5 увеличивает концентрацию свободного кальция и способствует высвобождению эластазы, активируя миграцию нейтрофилов и инициацию синтеза биологически активных веществ [3, 4]. В современных научных исследованиях ENA-78/CXCL5 рассматривается как хемокин, участвующий в воспалительных реакциях и в аутоиммунных процессах [4]. Доказана взаимосвязь экспрессии ENA-78/CXCL5 в сыроворотке крови с антинейронными аутоантителами

у детей, страдающих аутизмом [3, 4]. Известно, что ENA-78/CXCL5 может синтезироваться вместе с IL-8 и фактором роста меланомы под влиянием ЛПС микроорганизмов и провоспалительных цитокинов за очень короткий период времени [3, 4]. Эозинофилы, синтезируя ENA-78/CXCL5, способны активировать миграцию нейтрофилов, имеющих на своей поверхности рецептор CXCR2, а также способствовать реструктуризации соединительной ткани [3, 4]. Однако патофизиологическая роль ENA-78/CXCL5 в развитии атопического дерматита до сих пор неизвестна. В современных научных источниках не представлена информация о роли хемокина ENA-78/CXCL5 в патогенезе атопического дерматита, что привлекло наше внимание для его изучения.

Цель настоящего исследования заключалась в изучении динамики уровня хемокина ENA-78/

CXCL5 в сыворотке крови и в кожном экссудате у пациентов с atopическим дерматитом, а также в определении патофизиологической роли хемокина в патогенезе дерматоза.

Материалы и методы

Обследование и терапия пациентов, забор биологического материала проводились на базе ГУЗ «Краевой кожно-венерологический диспансер» Минздрава Забайкальского края, г. Чита. Лабораторные исследования были выполнены в НИИ Медицинской экологии, лаборатории экспериментальной и клинической биохимии и иммунологии ФГБОУ ВО «Читинская государственная медицинская академия» Минздрава России. Исследование одобрено Локальным этическим комитетом ФГБОУ ВО «Читинская государственная медицинская академия» Минздрава России.

Все пациенты, включенные в исследование, были полностью информированы о ходе его проведения, что отражено в добровольном информированном согласии, которое каждый пациент подписал перед включением его в группу исследования. Критериями включения пациентов в исследование являлись: наличие диагноза atopический дерматит, стаж заболевания более 2 лет, наличие подписанного добровольного информированного согласия, отсутствие сопутствующих заболеваний, в том числе хронических в стадию ремиссии. К критериям исключения относили сопутствующие хронические заболевания в анамнезе, проведение лекарственной терапии (НПВС, H1-блокаторы, системные и топические глюкокортикостероиды, циклоспорины, ингибиторы кальциневрина) и/или общей узкополосной средневолновой ультрафиолетовой терапии в течение 2 месяцев до включения пациента в исследование, беременность и лактация, клинические признаки вторичного инфицирования кожи, длительность ремиссии заболевания менее 2 месяцев после купирования обострения заболевания в рамках исследования [2].

Под наблюдением находились 80 пациентов в возрасте от 13 до 44 лет. Из них 39 пациентов (48,75%) женского пола и 41 пациент (51,25%) мужского пола. Было сформировано 2 группы исследования: подростки — от 13 до 18 лет ($n = 40$) и взрослые от 18 до 44 лет ($n = 40$). Каждая группа была разделена на 2 подгруппы: пациенты с ограниченной ($n = 20$) и с распространенной формой ($n = 20$) atopического дерматита. Диагностику заболевания проводили, базирясь на критерии Hanifin и Rajka и шкалу SCORAD [5, 6].

Контрольные группы подростков и взрослых составили 30 здоровых добровольцев, которые на момент осмотра были клинически здоровы, не

имели сенсibilизации к аллергенам, хронических заболеваний, в том числе в стадию ремиссии, кожных морфологических элементов, отягощенного наследственного аллергологического анамнеза и в течение одного месяца до включения в исследование не применяли лекарственные препараты системного и топического действия.

Забор крови для исследования осуществлялся из локтевой вены в одноразовые пробирки для забора крови Vacutainer с цитратом натрия утром натощак как у пациентов, так и у здоровых добровольцев. Центрифугирование проводилось при 3000 об/мин в течение 15 минут, полученную плазму хранили при -70°C до исследования. Забор кожного экссудата у пациентов с atopическим дерматитом осуществлялся с помощью одноразового инсулинового шприца и одноразовой иглы диаметром 20G из экссудативных морфологических элементов с последующим перемещением в одноразовые микропробирки емкостью 0,5 мл. Полученный кожный экссудат хранился при -70°C до исследования. У здоровых добровольцев кожный экссудат получали методом «кожного окна» согласно медицинской технологии В.В. Климова, А.А. Денисова, Е.К. Фирсовой и др. «Способ оценки минимальной воспалительной активности кожи при atopическом дерматите в стадии ремиссии» ФС № 2010/217 от 10.06.2010 [1]. Для осуществления данной технологии кожу на передней поверхности предплечья двукратно обрабатывали одноразовой спиртовой салфеткой, затем при помощи стерильного скальпеля осуществляли десквамацию верхних слоев эпидермиса до появления специфического блеска на участке кожи диаметром 0,5 см, при этом нетронутыми оставались слои базальных и шиповатых клеток [1]. На этот участок кожи плотно прикреплялась емкость объемом 2 мл, предварительно заполненная 1 мл 0,9%-ного раствора натрия хлорида, затем плотно фиксировалась гипоаллергенным пластырем и стерильным бинтом. Через 6 часов камеру снимали и одноразовым инсулиновым шприцем перемещали содержимое емкости в одноразовые микропробирки емкостью 1,5 мл с закрывающейся крышкой и хранили до исследования при -70°C [1].

Для исследования хемокина ENA-78/CXCL5 в сыворотке крови и кожном экссудате методом проточной цитофлуориметрии применяли панели The LEGEND plex TM Human Proinflammatory Chemokine Panel (США) в соответствии с протоколом производителя.

Статистическую обработку полученных лабораторных данных проводили с применением пакетов статистического анализа STATISTICA 6.1 для Windows. Для проверки на нормальность распределения количественных показателей ис-

пользовали критерий Шапиро—Уилка. Для статистической обработки данных, не подчиняющихся закону нормального распределения, использовали непараметрические методы. Для сравнения независимых выборок применяли U-критерий Манна—Уитни и Вилкоксона для парных признаков, а для проверки статистических гипотез при сравнении независимых выборок использовали непараметрический дисперсионный анализ Краскела—Уоллиса и медианный тест. Критический показатель уровня значимости и достоверности различий считался $p < 0,05$ (p_1 — статистически значимая разница при сравнении с контрольной группой; p_2 — статистически значимая разница при сравнении между обострением и ремиссией в одной возрастной группе; p_3 — статистически значимая разница между стадиями атопического дерматита в разных возрастных группах; p_4 — статистически значимая разница при сравнении между ограниченной и распространенной формами заболевания в кожном экссудате). Описательная статистика исследуемых показателей представлена медианой и межквартильными интервалами $Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})$.

Результаты и обсуждение

У подростков контрольной группы концентрация ENA-78/CXCL5 в сыворотке крови составляет 916,72 (788,91-1002,37) пг/мл, у взрослых — 928,69 (896,32-961,06) пг/мл. У подростков с ограниченной формой атопического дерматита

та в период обострения показатель увеличен до 1390,29 (1275,15-1532,17) пг/мл ($p_1 = 0,00001$), что на 51,6% превышает уровень в контроле, что связано с формированием патологического очага при атопическом дерматите. В ремиссии при разрешении клинических симптомов у подростков концентрация ENA-78/CXCL5 достоверно уменьшается в 2,4 раза, составляя 569,09 (506,31-625,37) пг/мл ($p_1 = 0,0001$; $p_2 = 0,00089$) (рис. 1).

У взрослых с ограниченными проявлениями в период обострения показатель равен 812,49 (703,95-975,17) пг/мл ($p_1 = 0,05$; $p_3 < 0,000010$), что на 13% меньше контрольных значений. В ремиссии концентрация ENA-78/CXCL5 в сыворотке крови снижается до 734,21 (580,4-821,23) пг/мл ($p_1 = 0,00015$; $p_2 = 0,056$; $p_3 = 0,004$).

Как у подростков, так и у взрослых с распространенной формой дерматоза в период обострения концентрация ENA-78/CXCL5 меньше, чем при ограниченной форме заболевания, так у подростков составляет 1117,41 (860,3-1695,55) пг/мл ($p_1 = 0,0014$), что превышает контрольное значение на 22%, у взрослых — 743,16 (591,65-845,79) пг/мл ($p_1 = 0,00017$; $p_3 = 0,00013$), что меньше контроля на 20%. В ремиссии атопического дерматита при распространенном процессе концентрация ENA-78/CXCL5 уменьшается у подростков и взрослых в 1,8 раза до 599,82 (499,17-840,64) пг/мл ($p_1 = 0,0007$; $p_2 = 0,002$) и 399,88 (300,06-574,24) пг/мл ($p_1 < 0,00001$; $p_2 = 0,0025$; $p_3 = 0,00013$) (рис. 2).

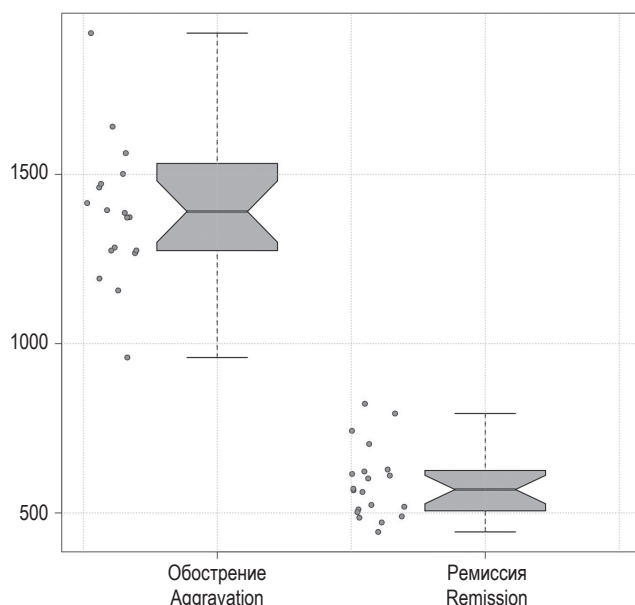


Рисунок 1. Концентрация ENA-78/CXCL5 в сыворотке крови (пг/мл) у подростков с ограниченной формой атопического дерматита

Figure 1. Concentration of ENA-78/CXCL5 in blood serum (pg/ml) in adolescents with a limited form of atopic dermatitis

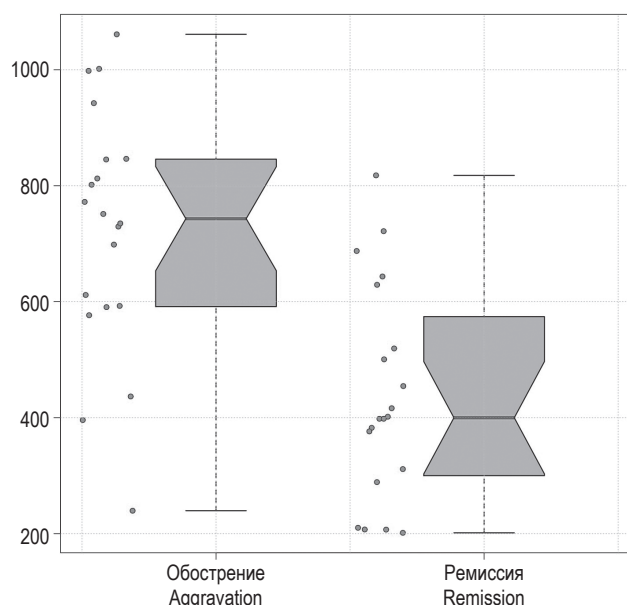


Рисунок 2. Концентрация ENA-78/CXCL5 в сыворотке крови у взрослых с распространенной формой атопического дерматита

Figure 2. Concentration of ENA-78/CXCL5 in the blood serum of adults with a common form of atopic dermatitis

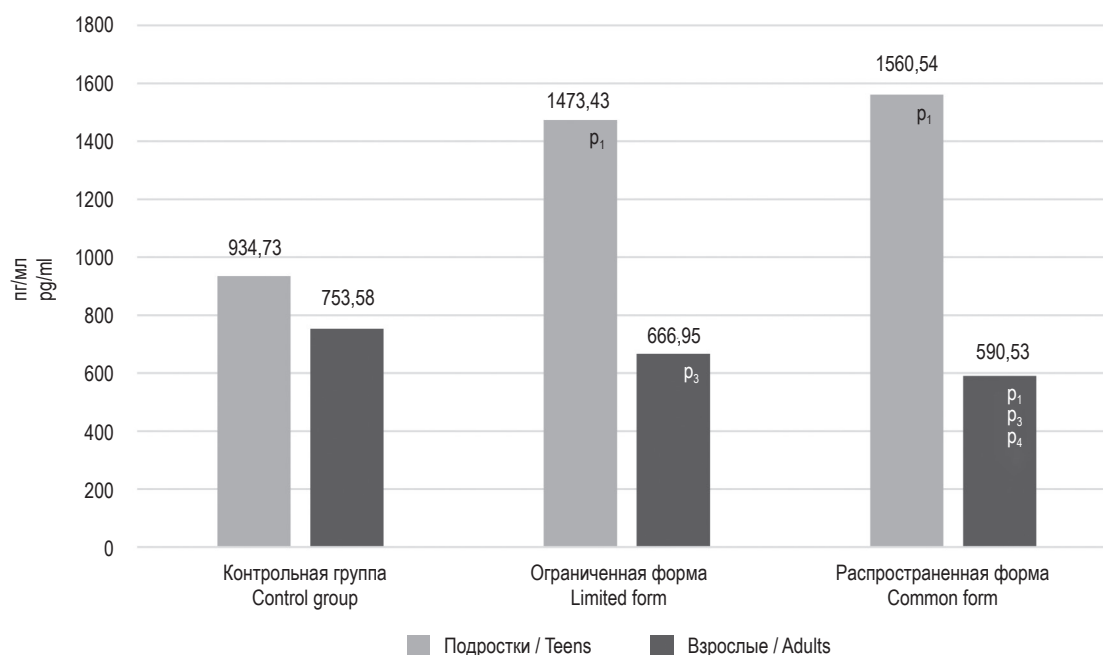


Рисунок 3. Концентрация ENA-78/CXCL5 в кожном экссудате в период обострения у пациентов с atopическим дерматитом

Figure 3. Concentration of ENA-78/CXCL5 in skin exudate during exacerbation in patients with atopic dermatitis

Концентрация ENA-78/CXCL5 в кожном экссудате, полученном методом «кожного окна», в контрольной группе подростков составляет 934,73 (888,14; 981,32) пг/мл, у взрослых — 753,58 (712,52-794,64) пг/мл. При ограниченной форме atopического дерматита у подростков в кожном экссудате уровень ENA-78/CXCL5 равен 1473,43 (1247,31-1836,23) пг/мл ($p_1 < 0,0001$), что при сравнении с контролем больше в 1,5 раза. У взрослых с аналогичной формой заболевания концентрация ENA-78/CXCL5 в кожном экссудате равна 666,95 (635,45-703,37) пг/мл ($p_1 < 0,0001$; $p_3 = 0,0000001$), что меньше показателя в контроле на 12% (рис. 3).

При распространенном кожном процессе в кожном экссудате у подростков уровень ENA-78/CXCL5 равен 1560,54 (993,87-2000,78) пг/мл ($p_1 = 0,002$; $p_4 = 0,25$), что на 67% больше контрольного значения и на 6% превосходит показатель при ограниченной форме дерматоза. У взрослых при распространенном процессе концентрация ENA-78/CXCL5 составляет 590,53 (394,26-693,38) пг/мл ($p_1 < 0,0001$; $p_3 = 0,000061$; $p_4 = 0,000018$), что достоверно меньше контроля на 21,6% и на 12% больше, чем при ограниченной дерматозе (рис. 3). Данная динамика уровня хемокина у подростков и взрослых может быть связана с разными клиническими проявлениями и особенностями локализации atopического дерматита.

Нами впервые изучена динамика уровня ENA-78/CXCL5 в сыворотке крови и кожном экссудате при atopическом дерматите. Выявлено, что у подростков и взрослых в период обострения atopического дерматита концентрация хемокина ENA-78/CXCL5 превышает показатель контрольной группы, что связано не только с формированием патологического кожного очага, но и с миграцией клеток, синтезирующих данный хемокин. Мы предполагаем, что уменьшение концентрации хемокина при распространенном кожном процессе связано не только с быстрым его связыванием с тропными рецепторами, но и с затратами хемокина для участия в активации миграции моноцитов и нейтрофилов в очаг поражения. Пул иммунных клеток, синтезирующих хемокин ENA-78/CXCL5, сконцентрирован в патологически измененной коже, однако по градиенту концентрации молекулы хемокина должны попасть в системный кровоток. Однако хемокин, проходя через гематодермальный барьер, разрушается лизосомальными ферментами путем неспецифического гидролиза и пептидазами.

Заключение

Выявлено, что у подростков концентрация хемокина ENA-78/CXCL5 больше, чем у взрослых с atopическим дерматитом как на системном уровне, так и в местном кожном процессе, что может обуславливать возрастные клинические особен-

ности дерматоза. Мы предполагаем, что хемокин ENA-78/CXCL5 в патологическом кожном очаге при atopическом дерматите способствует миграции нейтрофилов и моноцитов, активируя синтез соответствующих цитокинов и усиливая их фагоцитарную активность. Таким образом, хемокин ENA-78/CXCL5 при atopическом дерматите может являться маркером микробного звена патогена

неза дерматоза и клеточного повреждения в очаге поражения.

Благодарности

Коллектив авторов благодарит руководство ГУЗ «Краевой кожно-венерологический диспансер» Минздрава Забайкальского края в г. Чита за активное сотрудничество в проведении исследования.

Список литературы / References

1. Ермаков Е.А., Климов В.В. Анализ содержания цитокинов при atopическом дерматите в экссудате, полученном методом «кожного окна» // Успехи современного естествознания, 2013. № 9. С. 31-33. [Ermakov E.A., Klimov V.V. Analysis of the cytokine content in atopic dermatitis in the exudate obtained by the "skin window" method. *Uspekhi sovremennogo estestvoznaniya = Successes of Modern Natural Science*, 2013, no. 9, pp. 31-33. (In Russ.)]
2. Кибалина И.В., Цыбиков Н.Н. Роль эндотелина-1 и аутоантител к нему в патогенезе atopического дерматита: исследование случай-контроль // Вестник дерматологии и венерологии, 2021. Т. 97, № 1. С. 34-40. [Kibalina I.V., Tsybikov N.N. The role of endothelin-1 and its autoantibodies in the pathogenesis of atopic dermatitis: a case-control study. *Vestnik dermatologii i venerologii = Bulletin of Dermatology and Venereology*, 2021, Vol. 97, no. 1, pp. 34-40. (In Russ.)]
3. Лазарева Н.М., О.П. Баранова О.П., Кудрявцев И.В., Арсентьева Н.А., Любимова Н.Е., Сесь Т.П., Илькович М.М., Тотолян Арег А. Лиганды хемокинового рецептора CXCR3 при саркоидозе // Медицинская иммунология, 2021. Т. 23, № 1. С. 73-86. [Lazareva N.M., Baranova O.P., Kudryavtsev I.V., Arsentieva N.A., Lyubimova N.E., Ses' T.P., Ilkovich M.M., Totolian Areg A. CXCR3 chemokine receptor ligands in sarcoidosis. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2021, Vol. 23, no. 1, pp. 73-86. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-CCR-2181.
4. Mostafa G.A., AL-Ayadhi L.Y. The possible link between elevated serum levels of epithelial cell-derived neutrophil-activating peptide-78 (ENA-78/CXCL5) and autoimmunity in autistic children. *Behav. Brain Funct.*, 2015, Vol. 11, 11. doi.org/10.1186/s12993-015-0056-x.
5. Tsybikov N.N., Petrisheva I.V., Fefelova E.V., Kuznik B.I., Magen E. Plasma a-defensins are elevated during exacerbation of atopic dermatitis. *Clin. Exp. Dermatol.*, 2016, Vol. 41, no. 3, pp. 253-259.
6. Wollenberg A., Barbarot S., Bieber T. Consensus-based European guidelines for treatment of atopic eczema (atopic dermatitis) in adults and children: part I. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.*, 2018, Vol. 32, no. 5, pp. 657-682.

Авторы:

Кибалина И.В. — к.м.н., доцент кафедры дерматовенерологии ФГБОУ ВО «Читинская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения РФ, г. Чита, Россия
Цыбиков Н.Н. — д.м.н., профессор, заведующий кафедрой патологической физиологии ФГБОУ ВО «Читинская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения РФ, г. Чита, Россия
Фефелова Е.В. — д.м.н., доцент кафедры патологической физиологии ФГБОУ ВО «Читинская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения РФ, г. Чита, Россия

Authors:

Kibalina I.V., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Dermatovenereology, Chita State Medical Academy, Chita, Russian Federation
Tsybikov N.N., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Pathological Physiology, Chita State Medical Academy, Chita, Russian Federation
Fefelova E.V., PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Department of Pathological Physiology, Chita State Medical Academy, Chita, Russian Federation

Поступила 22.12.2021
Принята к печати 05.01.2022

Received 22.12.2021
Accepted 05.01.2022

ИЗМЕНЕНИЯ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ НЕЙТРОФИЛОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У ДЕТЕЙ РАННЕГО ВОЗРАСТА С РЕЦИДИВИРУЮЩЕЙ РЕСПИРАТОРНОЙ ИНФЕКЦИЕЙ

Куртасова Л.М.¹, Лубнина Т.В.², Сафонцева Е.В.³

¹ ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения РФ, г. Красноярск, Россия

² КГАУЗ «Красноярский краевой Центр профилактики и борьбы со СПИД», г. Красноярск, Россия

³ КГБУЗ «Межрайонная городская детская больница № 4», г. Красноярск, Россия

Резюме. Нейтрофильные гранулоциты характеризуются высокой мобилизационной активностью и способностью к быстрому и точному отражению изменений гомеостаза. Они первыми мобилизуются в очаг воспаления, и от их фагоцитарной активности зависит элиминация возбудителя. Данные, накопленные за последние десятилетия, позволили пересмотреть роль нейтрофилов и их участие в модуляции клеточного и гуморального иммунитета. Установлено, что нейтрофилы являются не только эффекторными, но и регуляторными клетками как врожденного, так и адаптивного иммунитета.

Цель исследования – изучение фагоцитарной активности и показателей кислородзависимого метаболизма нейтрофилов периферической крови у детей раннего возраста с рецидивирующей респираторной инфекцией.

Обследовано 111 детей в возрасте 1-3 лет с рецидивирующей респираторной инфекцией в период клинической ремиссии. Контрольную группу составили 24 здоровых ребенка в возрасте 1-3 лет. Фагоцитарную активность нейтрофилов периферической крови изучали в тесте с латексом. Люминозависимую хемилюминесценцию нейтрофилов крови исследовали по методу de Sole P. и соавт. (1983).

Исследование показателей фагоцитарной активности нейтрофилов периферической крови у детей с рецидивирующей респираторной инфекцией выявило на фоне снижения количества активно фагоцитирующих клеток сохранение ими поглотительной способности. Изучение параметров люминозависимой хемилюминесценции нейтрофилов периферической крови у детей с рецидивирующей респираторной инфекцией обнаружило изменения кислородзависимого метаболизма, которые зависели от варианта осложненного течения инфекции. В группе детей с бронхообструктивным синдромом параметры фоновой хемилюминесценции нейтрофилов периферической крови характеризовались ускорением времени выхода на пик хемилюминесцентной кривой. Показатели индуцированной опсонизированным зимозаном хемилюминесценции отражали сокращение времени реагирования на стимул, снижение интенсивности свечения «дыхательной вспышки» и тенденцию к понижению индекса активации в нейтрофилах периферической крови. Исследование параметров люминозависимой хемилюминесценции нейтрофилов периферической крови у детей с рецидивирующей респираторной инфекцией выявило на фоне снижения количества активно фагоцитирующих клеток сохранение ими поглотительной способности.

Адрес для переписки:

Куртасова Людмила Михайловна
ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого»
Министерства здравоохранения РФ
660022, Россия, г. Красноярск,
ул. Партизана Железняка, 1.
Тел.: 8 (391) 220-40-26.
Факс: 8 (391) 221-16-38.
E-mail: kurtasova.lm@mail.ru

Address for correspondence:

Kurtasova Lyudmila M.
V. Voyno-Yasensky Krasnoyarsk State Medical University
660022, Russian Federation, Krasnoyarsk, Partizan
Zheleznyak str., 1.
Phone: 7 (391) 220-40-26.
Fax: 7 (391) 221-16-38.
E-mail: kurtasova.lm@mail.ru

Образец цитирования:

Л.М. Куртасова, Т.В. Лубнина, Е.В. Сафонцева
«Изменения функциональной активности нейтрофилов
периферической крови у детей раннего возраста
с рецидивирующей респираторной инфекцией» //
Медицинская иммунология, 2022. Т. 24, № 2.
С. 407-412. doi: 10.15789/1563-0625-CIF-2407
© Куртасова Л.М. и соавт., 2022

For citation:

L.M. Kurtasova, T.V. Lubnina, E.V. Safontseva "Changes
in functional activity of peripheral blood neutrophils in young
children with recurrent respiratory infection", Medical
Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2022,
Vol. 24, no. 2, pp. 407-412.
doi: 10.15789/1563-0625-CIF-2407
DOI: 10.15789/1563-0625-CIF-2407

висимой хемилюминесценции в нейтрофилах периферической крови у детей с гипертрофией глоточной миндалины не выявило изменений показателей фоновой хемилюминесценции. Оценка стимулированной опсонизированным зимозаном хемилюминесценции нейтрофилов периферической крови обнаружила сокращение времени реагирования на стимул, снижение максимума «дыхательной вспышки» и уменьшение площади под хемилюминесцентной кривой. Таким образом, в группе детей с бронхообструктивным синдромом нарушена кинетика спонтанного хемилюминесцентного ответа нейтрофилов периферической крови. При стимуляции нейтрофилов *in vitro* сохраняются изменения кинетики хемилюминесцентного ответа и наблюдается тенденция к понижению резервных возможностей кислородзависимого метаболизма. В группе детей с гипертрофией глоточной миндалины изменения хемилюминесцентного ответа нейтрофилов периферической крови отмечаются только при индукции опсонизированным зимозаном. Наблюдается сохранение компенсаторных метаболических возможностей нейтрофилов периферической крови в нагрузочных тестах с опсонизированным зимозаном.

Результаты исследования показали однонаправленные изменения показателей фагоцитарной активности нейтрофилов периферической крови в группе детей с бронхообструктивным синдромом и в группе детей с гипертрофией глоточной миндалины с рецидивирующей респираторной инфекцией. Изменения параметров люминолзависимой хемилюминесценции нейтрофилов периферической крови зависели от варианта осложненного течения рецидивирующей респираторной инфекции. Показатели хемилюминесценции нейтрофилов периферической крови были более выраженными в группе детей с бронхообструктивным синдромом.

Ключевые слова: нейтрофилы, фагоцитоз, хемилюминесценция, дети, рецидив, респираторная инфекция

CHANGES IN FUNCTIONAL ACTIVITY OF PERIPHERAL BLOOD NEUTROPHILS IN YOUNG CHILDREN WITH RECURRENT RESPIRATORY INFECTION

Kurtasova L.M.^a, Lubnina T.V.^b, Safontseva E.V.^c

^a V. Voyno-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University, Krasnoyarsk, Russian Federation

^b Krasnoyarsk Regional Center for Prevention and Control of AIDS, Krasnoyarsk, Russian Federation

^c Interdistrict City Pediatric Hospital No. 4, Krasnoyarsk, Russian Federation

Abstract. Neutrophils characterized by high mobility and ability for quick and accurate reresponse upon homeostatic changes. These changes primarily occur at the inflammation site. The pathogen elimination depends on the phagocytic activity of neutrophils. The data from past decades have revisited the role of neutrophils and their involvement in changing the human cellular and humoral immunity. Neutrophils are not only effector cells, but also regulatory cells of both innate and adaptive immunity.

Our purpose was to study phagocytic activity and parameters of oxygen-dependent metabolism of peripheral blood neutrophils in young children with recurrent respiratory infections. We examined 111 children aged 1-3 years with recurrent respiratory infections over the period of clinical remission. The control group consisted of 24 healthy children aged 1-3 years. Phagocytic activity of peripheral blood neutrophils was studied by the latex test. Luminol-dependent chemiluminescence of blood neutrophils was studied according to de Sole et al. (1983).

The study of phagocytic indexes of peripheral blood neutrophils in the children with recurrent respiratory infections has revealed a decrease in the number of actively phagocytizing cells and preservation of their absorptive capacity. Studies of luminol-dependent chemiluminescence in peripheral blood neutrophils in children with recurrent respiratory infections revealed changes in oxygen-dependent metabolism depending on the clinical variant of complicated infection. In the group of children with broncho-obstructive syndrome, the background chemiluminescence parameters of peripheral blood neutrophils were characterized by faster time to chemiluminescence curve peak. Chemiluminescence indices induced by opsonized zymosan showed a lower time of reaction to stimuli, decreased intensity of “respiratory burst”-associated luminescence, and decreased trend for activation index of peripheral blood neutrophils. Study of luminol-dependent chemiluminescence

peripheral in blood neutrophils in children with hypertrophy of pharyngeal tonsils did not reveal changes in the background chemiluminescence levels. Chemiluminescence evaluation upon stimulation of peripheral blood neutrophils by opsonized zymosan caused a decrease in the stimulated response time, lower maximal “respiratory burst”, and decrease in AUC chemiluminescence. Thus, kinetics of spontaneous chemiluminescent response in peripheral blood neutrophils is impaired in children with broncho-obstructive syndrome. Similarly, the *in vitro* neutrophil stimulation showed changes in chemiluminescent response kinetics and decreased reserve of oxygen-dependent metabolic capacity. In the children with hypertrophy of pharyngeal tonsil, we observed changes in chemiluminescent response of peripheral blood neutrophils only after opsonized zymosan induction. Compensatory metabolic capacity of peripheral blood neutrophils was retained in the opsonized zymosan stress tests.

The study results showed unidirectional changes in peripheral blood neutrophil phagocytic activity parameters both in children with broncho-obstructive syndrome, and in children with pharyngeal tonsil hypertrophy and recurrent respiratory infection.

Keywords: *phagocytosis, chemiluminescence, neutrophils, respiratory infection*

Введение

Нейтрофил принадлежит к наиболее реактивным клеткам крови. Он высокочувствителен к разнообразным изменениям внутренней среды, которые отражают нарушения гомеостаза во многих системах организма. В настоящее время нейтрофилы перестали считать клетками, обладающими исключительно антимикробной резистентностью. Получены данные, свидетельствующие, что нейтрофилы являются не только эффекторными, но и регуляторными клетками как врожденного, так и адаптивного иммунитета [1, 3].

Кроме того, установлено, что нейтрофилы участвуют в защите против внутриклеточных патогенов, в частности вирусов. При этом выявлено, что вирусы способны угнетать метаболизм нейтрофилов человека. Так, в остром периоде вирусной инфекции способность к активации гексозомонофосфатного шунта может снижаться на 80% и более. При острой вирусной инфекции лимфоглоточного кольца обнаружено изменение экспрессии мембранных рецепторов CD16⁺ и CD11b⁺ в популяции CD16⁺CD11b⁺ нейтрофильных гранулоцитов [4, 6].

Исследования, проведенные нами ранее, показали изменение функциональной активности нейтрофилов периферической крови у детей с гипертрофией глоточной миндалины [2].

Необходимо отметить, что в нейтрофилах человека обнаружена гистаминаза — фермент, разрушающий один из основных медиаторов гиперчувствительности немедленного типа — гистамин [1, 3].

При этом нейтрофилы обладают наибольшей из всех клеток организма способностью генерировать активные формы кислорода, оказывающие цитопатическое действие благодаря высокому содержанию в них NADPH-оксидазы и миелопероксидазы [3, 7].

Учитывая, вышеизложенное целью исследования явилось изучение фагоцитарной активности и показателей кислородзависимого метаболизма нейтрофилов периферической крови у детей раннего возраста с рецидивирующей респираторной инфекцией.

Материалы и методы

Под наблюдением находились 111 детей с рецидивирующей респираторной инфекцией в возрасте 1-3 лет. Из них 54 ребенка с бронхообструктивным синдромом (БОС) и 57 детей с гипертрофией глоточной миндалины (ГГМ). Частота респираторных инфекций в году составляла 6 раз и более. Гипертрофию глоточной миндалины верифицировали на основании жалоб (затруднение носового дыхания, дыхание через рот, отделяемое из носа) и эндоскопической картины (наличие аденоидных вегетаций II-III степени в полости носоглотки). Бронхообструктивный синдром характеризовался приступообразным кашлем, экспираторной одышкой и приступами удушья. Исследования проводили в период клинического благополучия и отсутствия терапии в течение месяца, предшествующего обследованию.

Контрольную группу составили 24 практически здоровых детей аналогичного возраста.

Выделение нейтрофилов проводили из цельной венозной гепаринизированной крови центрифугированием в двойном градиенте плотности фиколл-урографина: $\rho = 1,077 \text{ г/см}^3$ — для отделения лимфоцитов и $\rho = 1,119 \text{ г/см}^3$ — для выделения нейтрофилов. Фагоцитарную активность нейтрофилов изучали в тесте с частицами латекса. Определяли фагоцитарный индекс (ФИ) и фагоцитарное число (ФЧ).

Исследование люминолзависимой хемилюминесценции (ХЛ) нейтрофилов периферической крови проводили методом de Sole P. и соавт. [5] на ХЛ-анализаторе CL-3604 (Россия) в течение

90 мин. Определяли следующие показатели: время выхода на максимум (Tmax), максимальное значение (Imax) и площадь (S) под ХЛ-кривой. В качестве индуктора «дыхательного взрыва» использовали опсонизированный зимозан в концентрации 2 мг/мл (Sigma, США). Усиление стимулированной зимозаном хемилюминесценции, относительно спонтанной хемилюминесценции, оценивали соотношением Sсим./Сспон. и определяли как индекс активации (ИА).

Математическую обработку полученных данных проводили с использованием пакета прикладных программ Statistica v. 6.0 (StatSoft, Inc., США). Описательные статистики, учитывая нормальное распределение признаков, представлены средней арифметической (M) и стандартной ошибкой среднего ($\pm m$). Для изучения статистической значимости различий применяли t-критерий Стьюдента. Критический уровень значимости (p) при проверке статистических гипотез принимали при $p \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение

Изучение показателей фагоцитарной активности нейтрофилов периферической крови в группе детей с БОС обнаружило статистически значимое снижение количества активно фагоцитирующих клеток ($45,09\% \pm 3,55$) относительно показателей контрольной группы ($58,75\% \pm 2,71$, $p < 0,001$). В то же время фагоцитарное число ($6,36$ у.е. $\pm 0,42$) в группе детей с БОС не имело статисти-

чески значимых различий с группой контроля ($6,09$ у.е. $\pm 0,29$).

Исследование показателей фагоцитарной активности нейтрофилов периферической крови в группе пациентов с ГГМ установило статистически значимое снижение количества активно фагоцитирующих нейтрофилов ($49,27 \pm 2,46$) по сравнению с показателями контроля ($58,75\% \pm 2,71$, $p < 0,001$). При этом значения фагоцитарного числа ($6,55$ у.е. $\pm 0,25$) статистически значимо не отличались от величин контрольной группы ($6,09$ у.е. $\pm 0,29$).

Анализ показателей люминолзависимой ХЛ в группе детей с БОС выявил статистически значимое сокращение времени выхода на максимум свечения спонтанной ХЛ нейтрофилов периферической крови по сравнению с параметрами контрольной группы (табл. 1).

При индукции хемилюминесцентной реакции опсонизированным зимозаном установлено статистически значимое уменьшение времени реагирования на стимул, снижение максимального уровня «дыхательной вспышки», а также выраженную тенденцию к понижению индекса активации в группе детей с БОС относительно показателей в группе контроля (табл. 1).

Известно, что функциональные возможности нейтрофилов проявляются только на фоне стимулирующих воздействий. При этом стимуляция радикально меняет метаболический профиль нейтрофила. В то же время одним из универсальных проявлений реактивности нейтрофила явля-

ТАБЛИЦА 1. ПОКАЗАТЕЛИ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ НЕЙТРОФИЛОВ КРОВИ У ПАЦИЕНТОВ С БРОНХООБСТРУКТИВНЫМ СИНДРОМОМ (M $\pm$ m)

TABLE 1. INDICATORS CHEMILUMINESCENCE BLOOD NEUTROPHILS IN CHILDREN WITH BROCHOOOLSTRUCTIVE SYNDROME (M $\pm$ m)

Показатель Indicator	Контрольная группа Control group (n = 24)	Бронхообструктивный синдром Brochoolstructive syndrome (n = 54)	p
Спонтанная хемилюминесценция Spontaneous chemiluminescence			
Tmax, сек. Tmax, sec.	2220,62 $\pm$ 181,63	1797,10 $\pm$ 85,20	0,05
Imax, о.е. $\times 10^3$	2,99 $\pm$ 0,24	2,85 $\pm$ 0,33	
S, о.е. $\times 10^5$	3,58 $\pm$ 0,30	3,13 $\pm$ 0,33	
Индукцированная хемилюминесценция Induced chemiluminescence			
Tmax, сек. Tmax, sec.	2460,00 $\pm$ 81,24	2181,80 $\pm$ 84,20	0,05
Imax, о.е. $\times 10^3$	11,51 $\pm$ 1,03	6,71 $\pm$ 1,00	0,05
S, о.е. $\times 10^5$	11,27 $\pm$ 1,08	11,05 $\pm$ 1,94	
Sсим./Сспон. Ssim./Sspon.	3,94 $\pm$ 0,38	2,83 $\pm$ 0,33	0,1 > p > 0,05

ТАБЛИЦА 2. ПОКАЗАТЕЛИ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ НЕЙТРОФИЛОВ КРОВИ У ПАЦИЕНТОВ С ГИПЕРТРОФИЕЙ ГЛОТОЧНОЙ МИНДАЛИНЫ (M±m)

TABLE 2. INDICATORS CHEMILUMINESCENCE BLOOD NEUTROPHILS IN CHILDREN WITH HYPERTROPHY OF THE PHARYNX GEAL TONSE (M±m)

Показатель Indicator	Контрольная группа Control group (n = 24)	Гипертрофия глоточной миндалины Hypertrophy of the pharynx geal tonse (n = 57)	p
Спонтанная хемилюминесценция Spontaneous chemiluminescence			
Tmax, сек. Tmax, sec.	2220,62±181,63	1886,00±132,41	
Imax, о.е. × 10³	2,99±0,24	3,66±0,37	
S, о.е. × 10⁵	3,58±0,30	2,87±0,28	
Индукцированная хемилюминесценция Induced chemiluminescence			
Tmax, сек. Tmax, sec.	2460,00±81,24	2150,66±73,91	0,01
Imax, о.е. × 10³	11,51±1,03	7,38±0,66	0,01
S, о.е. × 10⁵	11,27±1,08	5,99±0,58	0,001
Sзим./Сспон. Ssim./Sspon.	3,94±0,38	3,05±0,32	

ется респираторный взрыв [2, 3]. Важно отметить, что метаболический взрыв нейтрофил использует для «вооружения» против микробов и других объектов, которые воспринимаются им как факторы, нарушающие структурный гомеостаз.

Результаты проведенного нами исследования отметили в группе детей с БОС нарушение способности нейтрофилов периферической крови к выработке активных форм кислорода (АФК) в ответ на стимуляцию *in vitro*, о чем свидетельствует снижение интенсивности респираторного взрыва в нагрузочных пробах и выраженная тенденция к уменьшению величины индекса активации клеток в тесте с зимозаном, отражающего понижение компенсаторных возможностей АФК-продуцирующих систем клетки.

Оценка параметров люминолзависимой хемилюминесценции в группе детей с ГГМ не обнаружила статистически значимых различий показателей фоновой ХЛ нейтрофилов периферической крови с величинами контрольной группы (табл. 2).

При стимуляции хемилюминесцентной реакции нейтрофилов крови опсонизированным зимозаном в группе детей с ГГМ наблюдается статистически значимое сокращение времени реагирования на стимул, снижается уровень респираторной вспышки и уменьшается площадь под ХЛ-кривой по сравнению с контрольными показателями (табл. 2). В то же время необходимо отметить, что показатели индекса активации в

группе детей с ГГМ не имеют статистически значимых различий с параметрами группы контроля (табл. 2). Данные результаты отражают сохранение компенсаторных метаболических возможностей нейтрофилов периферической крови в группе детей с ГГМ.

Сравнительный анализ показал, что в группе детей с БОС отмечаются нарушения кинетики фоновой хемилюминесценции нейтрофилов периферической крови, в то время как в группе детей с ГГМ изменений не было обнаружено. При стимуляции ХЛ-ответа опсонизированным зимозаном в группе детей с БОС наблюдается выраженная тенденция к снижению адаптивных метаболических возможностей нейтрофилов периферической крови. В группе детей с ГГМ компенсаторные возможности АФК-продуцирующей системы нейтрофилов крови сохранены.

Таким образом, в ходе проведенного исследования установлены изменения ХЛ-ответа нейтрофилов периферической крови у детей с рецидивирующей респираторной инфекцией. При этом выявленные изменения зависят от варианта осложненного течения рецидивирующей респираторной инфекции.

Заключение

Результаты проведенного исследования обнаружили у детей с рецидивирующей респиратор-

ной инфекцией на фоне снижения количества активно фагоцитирующих нейтрофилов периферической крови сохранения ими поглотительной способности. Кроме того, полученные нами данные установили изменение показателей люминозависимой хемилюминесценции нейтрофилов периферической крови у детей с рециди-

вирующей респираторной инфекцией, которые зависели от варианта осложненного течения инфекции. Данное обстоятельство, безусловно, необходимо учитывать при разработке иммунокорректирующих мероприятий у детей с осложненным течением рецидивирующей респираторной инфекции.

Список литературы / References

1. Долгушин И.И., Савочкина А.Ю. Секреторные функции нейтрофилов // Аллергология и иммунология, 2015. Т. 16, № 2. С. 210-212. [Dolgushin I.I., Savochkina A.Yu. Secretory functions of neutrophils. *Allergologiya i immunologiya = Allergology and Immunology*, 2015, Vol. 16, no. 2, pp. 210-213. (In Russ.)]
2. Куртасова Л.М., Лубнина Т.В. Изменения функционально-метаболической активности нейтрофилов периферической крови у детей с гипертрофией глоточной миндалины // Сибирское медицинское обозрение, 2014. № 4. С. 44-47. [Kurtasova L.M., Lubnina T.V. Changes in the functional-metabolic activity of peripheral blood neutrophils in children with hypertrophy of the pharyngeal tonsil. *Sibirskoe meditsinskoe obozrenie = Siberian Medical Review*, 2014, no. 4, pp. 44-47. (In Russ.)]
3. Нестерова И.В., Колесникова Н.В., Чудилова Г.А., Ломтатидзе Л.В., Ковалева С.В., Евглевский А.А. Нейтрофильные гранулоциты: новый взгляд на «старых игроков» на иммунологическом поле // Иммунология, 2015. № 4. С. 257-265. [Nesterova I.V., Kolesnikova N.V., Chudilova G.A., Lomtadze L.V., Kovaleva S.V., Evglevsky A.A. Neutrophilic granulocytes: a new look at "Old players" on the immunological field 1 sbei. *Immunologiya = Immunology*, 2015, no. 4, pp. 257-265. (In Russ.)]
4. Нестерова И.В., Чудилова Г.А., Ломтатидзе Л.В., Ковалева С.В., Колесникова Н.В., Авдеева М.Г., Русина Т.В. Дифференцированность вариантов субпопуляций трансформированного фенотипа CD16⁺CD11b⁺ нейтрофильных гранулоцитов при острой вирусной и острой бактериальной инфекции // Иммунология, 2016. № 4. С. 199-204. [Nesterova I.V., Chudilova G.A., Lomtadze L.V., Kovaleva S.V., Kolesnikova N.V., Avdeeva M.G., Rusinova T.V. Differentiation of variants subpopulations transformed phenotype CD16⁺CD11b⁺ neutrophils in acute viral and acute bacterial infections 1 sbei HPE. *Immunologiya = Immunology*, 2016, no. 4, pp. 199-204. (In Russ.)]
5. de Sole P., Lippa S., Lixxarru G. Whole blood chemiluminescence: a new technical approach to access oxygen-dependent microbial activity of granulocytes. *J. Clin. Lab. Autom.*, 1983, Vol. 3, pp. 391-400.
6. Hung S.L., Chiang Y.T. Effects of herpes simplex virus type 1 infection on immune functions of human neutrophils. *J. Periodont. Res.*, 2012, Vol. 4, pp. 1600-1665.
7. Winterbourn C.C., Kettle A.J. Redox reactions and microbial killing in the neutrophil phagosome. *Antioxid. Redox Signal.*, 2013, Vol. 18, no 6, pp. 642-660.

Авторы:

Куртасова Л.М. — д.м.н., профессор кафедры госпитальной терапии и иммунологии с курсом после дипломного образования ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения РФ, г. Красноярск, Россия

Лубнина Т.В. — врач-инфекционист лечебно-консультативного отделения КГАУЗ «Красноярский краевой Центр профилактики и борьбы со СПИД», г. Красноярск, Россия

Сафонцева Е.В. — врач-оториноларинголог, заведующий приемно-диагностическим отделением КГБУЗ «Межрайонная городская детская больница № 4», г. Красноярск, Россия

Authors:

Kurtasova L.M., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Hospital Therapy and Immunology with a Course of Postgraduate Education, V. Voyno-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University, Krasnoyarsk, Russian Federation

Lubnina T.V., Clinical Infectiologist, Medical Counseling Department, Krasnoyarsk Regional Center for Prevention and Control of AIDS, Krasnoyarsk, Russian Federation

Safontseva E.V., ORL Doctor, Head, Ambulance and Diagnostic Department, Interdistrict City Pediatric Hospital No. 4, Krasnoyarsk, Russian Federation

Поступила 24.07.2021

Отправлена на доработку 05.01.2022

Принята к печати 29.01.2022

Received 24.07.2021

Revision received 05.01.2022

Accepted 29.01.2022

ПОКАЗАТЕЛИ ВРОЖДЕННОГО И ПРИОБРЕТЕННОГО ИММУНИТЕТА В ОЦЕНКЕ ТЯЖЕСТИ КЛИНИЧЕСКОГО СОСТОЯНИЯ ПАЦИЕНТОВ С ДЕТСКОЙ ШИЗОФРЕНИЕЙ

Андросова Л.В.¹, Симашкова Н.В.¹, Шушпанова О.В.¹, Отман И.Н.¹, Зозуля С.А.¹, Шушпанова Т.В.², Ключник Т.П.¹

¹ ФГБНУ «Научный центр психического здоровья», Москва, Россия

² Научно-исследовательский институт психического здоровья ФГБНУ «Томский научный исследовательский медицинский центр Российской Академии наук», г. Томск, Россия

Резюме. Результаты предыдущих исследований убедительно свидетельствуют о патогенетической роли иммунной системы в развитии шизофрении. При обследовании пациентов с шизофренией подросткового-юношеского и молодого возраста показано, что активность/уровень некоторых показателей врожденного и приобретенного иммунитета коррелирует с остротой и тяжестью патологического процесса в мозге больных. Выявление особенностей иммунной системы у пациентов с шизофренией детского возраста во взаимосвязи с тяжестью их клинической симптоматики, помимо потенциального терапевтического аспекта, может служить основой для ранней диагностики этих состояний, а также мониторинга и прогноза дальнейшего развития заболевания.

Цель исследования – сопоставление клинических и иммунологических показателей у детей с шизофренией для оценки возможности использования изучаемых иммунологических параметров для определения степени активности патологического процесса. Обследовано 62 пациента (39 мальчиков и 23 девочки) от 4 до 17 лет с детской шизофренией. Психическое состояние больных оценивалось психопатологическим и психометрическим методами (с использованием шкал PANSS и CGI-S). Иммунологические показатели определяли в сыворотке крови, взятой из пальца. Активность лейкоцитарной эластазы (ЛЭ) и α 1-протеиназного ингибитора (α 1-ПИ) определяли спектрофотометрическим методом. Для определения уровня аутоантител к S-100B и ОБМ использовали иммуноферментный анализ.

В результате проведенного исследования выявлена активация врожденного (по показателям активности ЛЭ и α 1-ПИ) и приобретенного (по уровню аутоантител к S-100B и ОБМ) в сыворотке крови детей с шизофренией. При проведении корреляционного анализа показана значимая положительная связь между комплексной оценкой уровня активации иммунной системы пациентов и тяжестью их состояния по шкале CGI-S ($r = 0,64$, $p < 0,0001$), а также выраженностью психопатологической симптоматики по подшкале негативных симптомов шкалы PANSS ($r = 0,34$, $p = 0,0077$).

Выявленные взаимосвязи свидетельствуют о возможности использования комплекса изучаемых иммунологических показателей (активности ЛЭ и α 1-ПИ, а также аутоантител к нейронантигенам) в качестве дополнительного лабораторного метода обследования для объективизации клинического состояния детей с шизофренией.

Ключевые слова: шизофрения детская, маркеры воспаления, активность лейкоцитарной эластазы, аутоантитела к нейронантигенам

Адрес для переписки:

Зозуля Светлана Александровна
ФГБНУ «Научный центр психического здоровья»
115522, Россия, Москва, Каширское шоссе, 34.
Тел.: 8 (495) 109-03-93 (доб. 3104).
E-mail: s.ermakova@mail.ru

Address for correspondence:

Zozulya Svetlana A.
Mental Health Research Centre
115522, Russian Federation, Moscow,
Kashirskoe highway, 34.
Phone: 7 (495) 109-03-93 (acc. 3104).
E-mail: s.ermakova@mail.ru

Образец цитирования:

Л.В. Андросова, Н.В. Симашкова, О.В. Шушпанова, И.Н. Отман, С.А. Зозуля, Т.В. Шушпанова, Т.П. Ключник «Показатели врожденного и приобретенного иммунитета в оценке тяжести клинического состояния пациентов с детской шизофренией» // Медицинская иммунология, 2022. Т. 24, № 2. С. 413-418.
doi: 10.15789/1563-0625-IAA-2375

© Андросова Л.В. и соавт., 2022

For citation:

L.V. Androsova, N.V. Simashkova, O.V. Shushpanova, I.N. Otman, S.A. Zozulya, T.V. Shushpanova, T.P. Klyushnik "Innate and acquired immunity indices in assessing the clinical severity of patients with childhood schizophrenia", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2022, Vol. 24, no. 2, pp. 413-418.
doi: 10.15789/1563-0625-IAA-2375
DOI: 10.15789/1563-0625-IAA-2375

INNATE AND ACQUIRED IMMUNITY INDICES IN ASSESSING THE CLINICAL SEVERITY OF PATIENTS WITH CHILDHOOD SCHIZOPHRENIA

Androsova L.V.^a, Simashkova N.V.^a, Shushpanova O.V.^a, Otman I.N.^a, Zozulya S.A.^a, Shushpanova T.V.^b, Klyushnik T.P.^a

^a Mental Health Research Centre, Moscow, Russian Federation

^b Research Institute of Mental Health, Tomsk Research Medical Center, Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russian Federation

Abstract. The results of previous studies suggest pathogenetic role of immune system in the development of schizophrenia. Examination of adolescent and young adult schizophrenic patients showed that the activity/level of distinct parameters of innate and acquired immunity correlates with acuity and severity of pathological process in the brain. Presumably, evaluation of immune system characteristics in patients with childhood schizophrenia, concerning severity of their clinical symptoms, along with potential therapeutic aspect, may be the basis for early diagnosis of these conditions, and monitoring and prognosis of the further progression of the disease.

The objective of our study was to compare clinical and immunological indices in children with schizophrenia to analyze the possibility of using these parameters for determination of the degree of activity of the pathological process. Sixty-two patients (39 boys and 23 girls) from 4 to 17 years of age with childhood schizophrenia were examined. Psychopathological and psychometric methods (PANSS and CGI-S scales) were used to assess mental state of the patients. Immunological parameters were determined in blood serum taken by fingerprick. Activity of leukocyte elastase (LE) and α 1-proteinase inhibitor (α 1-PI) was determined by spectrophotometric method. To determine the level of autoantibodies to S-100B and MBP, we used enzyme immunoassay.

The study revealed activation of innate (by activity of LE and α 1-PI) and acquired (by the level of autoantibodies to S-100B and MBP neuroantigens) immunity markers in blood serum of children with schizophrenia. Correlation analysis showed the significant positive correlation between complex evaluation of activation level of the immune system and severity of the patients' state on the CGI-S scale ($r = 0.64$, $p < 0.0001$), as well as severity of negative symptoms according to the PANSS scale ($r = 0.34$, $p = 0.0077$).

The revealed correlations suggest an opportunity for using immunological parameters (LE and α 1-PI activity, and antibodies to neuroantigens), as the additional laboratory criteria for the assessment of clinical state in patients with childhood schizophrenia.

Keywords: childhood schizophrenia, inflammation markers, activity of leukocyte elastase, autoantibodies to neuroantigens

Introduction

According to modern concepts, the inflammatory response is the most important physiological mechanism of chronic non-infectious diseases, including schizophrenia [3, 6, 11]. A large number of studies in the serum of patients with schizophrenia revealed improvement of various mediators of inflammation, acute phase proteins, and molecules involved in the increase in vascular permeability [8, 9, 12].

Inflammatory mediators are synthesized by cells of the innate (nonspecific) immune system (neutrophils, monocytes / macrophages, dendritic and NK cells, and others). The activation of Toll-like receptors on the surface of immunocompetent cells is caused not only by different exogenous (microorganisms, viruses, and et al.), but also by endogenous agents, that are

the products of the degradation of the body's tissues, which occurs in various pathological processes in the brain [1].

It is also known that in mental diseases in the blood of some patients can be identified autoantibodies to various molecular components of the brain, including neuron-specific proteins. Autoantibodies are immunoglobulin molecules synthesized by cells of acquired immunity (B lymphocytes).

Identification of inflammatory mediators and antibodies to neuroantigens in the blood of patients suffering from schizophrenia may be important in the pathogenesis of the disease assessment, adaptation of therapeutic programs for these patients, and may also improve the reliability of early detection of the disease, provide laboratory monitoring of disease development and its prognosis.

Previously, during the many years of clinical and immunological study of adolescents and young patients with schizophrenia, we have demonstrated that the enzymatic activity of leukocyte elastase, a protease contained in the azurophil granules of neutrophils, is positively correlates with the acuity of the clinical status of patients. The level of auto-antibodies to neuroantigens S-100B and myelin basic protein (MBP) is related to the severity of their condition [4, 5].

However, similar studies on patients with childhood schizophrenia have not been performed. At the same time, it is important that the age-related features of the immune system may significantly contribute to the realization of neuro-immune interactions not only in the norm but also in the development of pathological states of the nervous system.

The objective of the study was to compare clinical and immunological indices in children with schizophrenia to analyze the possibility of using these parameters in the determination of the degree of activity of the pathological process.

Materials and methods

The study was carried out in the Department of Child Psychiatry together with the Laboratory of Neuroimmunology of the FSBSI "Mental Health Research Centre" (Moscow, Russia) in the 2012-2015. The study involved 62 patients (39 boys and 23 girls from 4 to 17 years) with schizophrenia. The mean age of onset of the disease in all patients was 3.2 ± 2.7 years. The mean duration of the disease was 7.5 ± 3.4 years. The mental status of patients was assessed by psychopathological and psychometric methods using psychometric scales PANSS and CGI-S.

The criteria for inclusion of patients in the study were: the presence of a psychotic episode; a continuous malignant course leading patients to the hospitalization; the need for medication therapy of patients; informed consent of a parent or guardian of the child to participate in the study; compliance with modern standards of biomedical ethics in examining patients.

Exclusion criteria were: clinical and laboratory signs of inflammatory and infectious or autoimmune disorders, diagnosed within 1-2 months before the survey, as well as the post-vaccination period.

Based on the differences in clinical symptoms, patients were divided into 2 groups. The 1st group included 47 patients (29 boys and 18 girls from 4 to 16 years; mean age 10.9 ± 3.2 years) with a diagnosis of "childhood schizophrenia" – F20.8xx3 by ICD-10 (1994), adapted to the Russian Federation in 1999. In the clinical picture of patients of the 1st group, hyperkinetic, less often hypokinetic and partial productive catatonic disorders were identified in combination with the negative symptoms (regression,

severe autism). Later, the negative symptoms began to dominate. Patients developed deficits in the cognitive, energy (acquired by fatigue), and emotional spheres. The thinking was concrete with a reduced level of generalization, and a lack of abstraction. As the severity of the condition decreased, patients retained residual catatonic disorders in the form of subcortical protopathic motor stereotypies displacing purposeful movements.

The 2nd group consisted of 15 patients (10 boys and 5 girls aged 8 to 17 years; mean age 12.5 ± 4.5 years) with a diagnosis of "schizotypal disorder" (F21.x) according to ICD-10. The group of patients was heterogeneous in the positive symptoms, and the depth of the developing personality defect. According to the leading positive symptoms, all the patients were divided into two subgroups. The 1st subgroup included 10 patients (F21.3) with leading neurosis (anxiety-phobic, obsessive-compulsive) disorders. Negative disorders in children of this subgroup were confined to personal changes schizoid range, distortion, and the immaturity of the higher mental functions, retaining the ability to learn, socialization. The 2nd subgroup consisted of 5 patients (F21.4) with positive psychopathic disorders with aggression towards others, self-aggression, withdrawal, vagrancy, with eating disorders, affective disorders, accompanied by personality changes autism range with high sensitivity, pedantry, psychophysical infantilism.

The control group included 44 healthy children corresponding to patients by age and sex. The age of patients with schizophrenia did not differ from a control group ($p = 0.09$), as well as from patients with schizotypal disorder ($p = 0.1$).

The immunological parameters were determined in blood serum which was carried out from the finger. Formed elements were pelleted by centrifugation at 3000 rpm/min (700 g) for 15 minutes at 22 °C. Then the serum was collected, which was used for the analysis or immediately after preparation, or stored at a temperature 2 °C to 8 °C not more than a day or frozen at -18 °C to -24 °C for a month before analysis.

The following immunological parameters were studied: the enzymatic activity of leukocyte elastase (LE) (serine protease, which is a marker of the degranulating activity of neutrophils – one of the major cellular components of innate immunity); functional activity of $\alpha 1$ -proteinase inhibitor ($\alpha 1$ -PI) (an acute-phase protein is synthesized in the liver, the role of which is to limit the proteolytic activity of LE and to regulate of inflammatory response); the autoantibodies to S-100B and MBP produced by B lymphocytes (acquired immunity).

The enzymatic activity of LE was determined by an spectrophotometric method using the specific substrate N-tert-butoxy-carbonyl-alanine- β -nitrophenyl ester (BOC-Ala-ONp), and evaluated in

TABLE 1. INTERPRETATION OF ASSESSING THE SEVERITY OF THE DISORDERS ON THE PSYCHOMETRIC SCALES PANSS AND CGI

PANSS P	PANSS N	PANSS G	CGI-S	Degree of the severity of the disorders
7-11	7-10	16-27	1-2	Norm, borderline, mild
12-18	11-20	28-49	3-4	From moderate to marked
19-30	21-45	50-70	5-6	From marked to severe
31 and >	46 and >	71 and >	6-7	From severe to the most severe

Note. The highest score on any of the PANSS subscales determines the patient's CGI severity score. In some cases, the CGI score may be higher than the PANSS subscale score, based on the patient's condition (anorexia, delusional disorders, etc.).

TABLE 2. PSYCHOMETRIC ASSESSMENT OF PATIENTS WITH CHILDHOOD SCHIZOPHRENIA AND SCHIZOTYPAL DISORDER (PANSS AND CGI SCALES) Me ($Q_{0.25}$ - $Q_{0.75}$)

Diagnosis (ICD-10)	PANSS P	PANSS N	PANSS G	CGI-S	Degree of the severity of the disorders
Childhood schizophrenia (F20.8xx3) (n = 47)	20 (17-22)	45 (37-47)	54 (48-56)	6 (6-6)	From moderate to the most severe
Schizotypal disorder (F21.x) (n = 15)	16 (12-18)	18 (16-23)	51 (43-54)	5 (4-5)	From moderate to marked

TABLE 3. IMMUNOLOGICAL INDICES IN PATIENTS WITH CHILDHOOD SCHIZOPHRENIA AND SCHIZOTYPAL DISORDER, Me ($Q_{0.25}$ - $Q_{0.75}$)

Groups	LE activity, nmol/min × ml	α 1-PI, IU/ml	AAB to S-100B, OD	AAB to MBP, OD
Control (n = 44)	194.4 (172.8-208.4)	32.5 (28.2-36.1)	0.69 (0.62-0.79)	0.66 (0.58-0.72)
Childhood schizophrenia (n = 47)	245.2** (218.6-255.0)	43.7** (38.5-50.2)	0.85** (0.73-1.01)	0.72* (0.60-0.84)
Schizotypal disorder (n = 15)	230.7** (218.2-267.8)	42.7** (37.7-51.7)	0.76 (0.69-0.80)	0.70 (0.58-0.81)

Note. Statistical differences with control: *, $p < 0.05$; **, $p < 0.00001$.

nmol/min × ml (the sensitivity is 40 nmol/min × ml) [2]; functional α 1-PI activity was detected by the spectrophotometric method and in inhibitory units/ml (IU/ml) (the sensitivity is 5 IU/mL) [10]. The level of autoantibodies to S-100B and MBP was determined by immunosorbent assay [7] using antigen S-100B and MBP (Sigma, USA). The autoantibody titer was estimated by optical density (OD).

Statistical analysis was performed using non-parametric statistical software Statistica-10 (StatSoft., Inc, USA). The data in the Tables 2, 3 and text are presented as Medians – Me ($Q_{0.25}$ - $Q_{0.75}$). Inter group

differences were determined using the Mann–Whitney test. To evaluate the clinical and immunological relationships using the correlation coefficient of Spearman. We used a confidence level: $p \leq 0.05$.

Results and discussion

On the scale PANSS adapted to children's age, we evaluated the positive (P), negative (N), general psychopathological symptoms (G). Furthermore, within each subscale, the severity of related disorders (Table 1) was determined. This "categorical" assessment of symptoms on the PANSS subscales is ne-

cessary to compare psychometric data with a comprehensive assessment of patients' immune system state.

The CGI scale (Clinical Global Impression Scale) score in points corresponds to different general severity of the disease: the 1st subgroup – mild disorders with scores from 1 to 2; the 2nd subgroup 2 – 3–4 points (from moderate to marked); the 3rd subgroup – 5–6 points (from marked to severe); the 4th subgroup 6–7 points (from severe to the most severe).

From the data presented (Tables 1, 2), it can be seen that in the group of patients with a diagnosis of “childhood schizophrenia” prevailing negative disturbances which may indicate a predominate and cognitive deficiency of this cohort of patients, as well as an unfavorable outcome of the disease. In the group of patients with a diagnosis of “schizotypal disorder” the negative changes are minimal, these patients have the highest overall score on a scale of general psychopathological symptoms (affective, obsessive, psychopathic condition, etc.).

Table 3 presents the results of a study of immunological parameters in children with schizophrenia and schizotypal disorder. In the group of children with schizophrenia a statistically significant increase in activity of LE ($p < 0.0001$), $\alpha 1$ -PI ($p < 0.0001$), as well as the level of antibodies to S-100B ($p < 0.0001$), and MBP ($p < 0.05$) was revealed compared to the control group.

The group of children with schizotypal disorder was also characterized by a significant increase in the activity of LE ($p < 0.0001$) and $\alpha 1$ -PI ($p < 0.0001$) compared to the control. But the level of autoantibodies to neuroantigens remained in the control range ($p > 0.05$).

To identify possible relationships between clinical and biological indicators the patients with schizophrenia and schizotypal disorders were integrated into a single group: weak positive correlations were found between the activity of LE and the severity of negative symptoms on the PANSS scale ($r = 0.28$, $p = 0.05$) and between the level of antibodies to S-100B and scores on the CGI-S scale ($r = 0.29$, $p = 0.02$). We also revealed a negative correlation between the functional activity of $\alpha 1$ -PI and the level of autoantibodies to the S-100B ($r = -0.30$, $p = 0.04$), and a positive correlation between the autoantibodies to the S-100B and MBP ($r = 0.47$, $p = 0.0001$), reflecting, possibly, existing functional relationship between innate and acquired immunity.

Thus, this sample of patients with childhood schizophrenia and schizotypal disorders was found activation of inflammatory (by LE and $\alpha 1$ -PI activity) and autoimmune (the level of autoantibodies to neuroantigens) reactions. Results obtained corresponds to the previously obtained ones during

the examination of patients' adolescent and young age [4, 5].

However, there was no evidence of pronounced linkages between individual immunological parameters and clinical features of patients on psychometric scales.

The study of clinical and immunological relationship revealed a high significant positive correlation between the complex assessment of the level of activation of patients' immune system and the severity of their clinical condition on the CGI-S scale ($r = 0.64$, $p = 0.000001$), as well as the correlation with the severity of negative symptoms assessed to the PANSS scale ($r = 0.34$, $p = 0.0077$).

It is known, that innate and acquired immunity are the two interacting parts of a single system that ensures the development of an immune response to a violation of homeostasis. The innate immunity is the evolutionarily more ancient primary “protective echelon” that implements its function by inflammation and phagocytosis, ensuring the elimination of pathogens or endogenous molecules that enter the bloodstream at the destructive processes in the body's tissues, in the first few minutes/hours after their appearance when the mechanisms of acquired immunity are not yet available. Acquired immunity is the second phase of the protective reaction of the organism, which is realized by the synthesis of specific antibodies or autoantibodies. The presence of neuroantigens characterizes the most severe and progressive pathologic state in which the restoration of homeostasis can not be achieved only by inflammatory mechanisms [12].

Conclusion

The results indicate the involvement of the immune system in the pathogenesis of schizophrenia and schizophrenia spectrum disorders in children.

The most severe and progressive pathological conditions in patients with childhood schizophrenia are accompanied by activation of both innate (LE and $\alpha 1$ -PI activity) and acquired (autoantibodies to S-100B and MBP) immunity. In patients with schizotypal disorders, the activation of only innate immunity was revealed.

The correlations between a comprehensive assessment of the level of activation of the immune system and the severity of the patients' clinical state confirm the relationship of the studied immune markers with the activity of the pathological process in the brain. The results suggest an opportunity for using these immune indices as the additional laboratory criteria for the assessment of the clinical state of children with schizophrenia, which is important for the diagnosis, monitoring and prognosis of the disease.

References

1. Buckley P.F. Neuroinflammation and schizophrenia. *Curr. Psychiatry Rep.*, 2019, Vol. 21, no. 8, 72. doi: 10.1007/s11920-019-1050-z.
2. Dotsenko V.L., Neshkova E.A., Yarovaya G.A. Detection of human leukocyte elastase from the complex with plasma α 1-proteinase inhibitor on the basis of its enzyme activity with a synthetic substrate. *Problems of Medical Chemistry*, 1994, Vol. 40, no. 30, pp. 20-25. (In Russ.)
3. Enache D., Pariante C.M., Mondelli V. Markers of central inflammation in major depressive disorder: A systematic review and meta-analysis of studies examining cerebrospinal fluid, positron emission tomography and post-mortem brain tissue. *Brain Behav. Immunol.*, 2019, Vol. 81, pp. 24-40.
4. Klyushnik T.P., Androsova L.V., Simashkova N.V., Zozulya S.A., Otman I.N., Koval-Zaytsev A.A. Innate and adaptive immunity in children with psychotic forms of autism-spectrum disorders. *S. Korsakov Journal of Neurology and Psychiatry*, 2011, Vol. 111, no. 8, pp. 41-45. (In Russ.)
5. Klyushnik T.P., Barkhatova A.N., Sheshenin V.S., Androsova L.V., Zozulya S.A., Otman I.N., Pochueva V.V. Specific features of immunological reactions in elderly and young patients with exacerbation of schizophrenia. *S. Korsakov Journal of Neurology and Psychiatry*, Vol. 121, no. 2, pp. 53-59. (In Russ.)
6. Klyushnik T.P., Smulevich A.B., Zozulya S.A., Voronova E.I. Neurobiology of schizophrenia (to the construction of clinical and biological model). *Psychiatry*, 2021, Vol. 19, no. 1, pp. 6-15. (In Russ.)
7. Klyushnik T.P., Zozulya S.A., Androsova L.V., Sarmanova Z.V., Otman I.N., Panteleeva G.P., Oleichik I.V., Kopeiko G.I., Borisova O.A., Abramova L.I., Bologov P.V., Stolyarov S.A. Laboratory diagnostics in monitoring patients with endogenous psychoses ("Neuro-immuno-test." Medical technology)]. Moscow: Medical Information Agency, 2016. 32 p.
8. Kose M., Pariante C.M., Dazzan P., Mondelli V. The role of peripheral inflammation in clinical outcome and brain imaging abnormalities in psychosis: a systematic review. *Front. Psychiatry*, 2021, Vol. 12, 612471. doi: 10.3389/fpsyt.2021.612471.
9. Miller B.J., Goldsmith D.R. Towards an immunophenotype of schizophrenia: progress, potential mechanisms, and future directions. *Neuropsychopharmacology*, 2017, Vol. 42, no. 1, pp. 299-317.
10. Nartikova V.F., Pashina T.S. A method for estimation of α 1-antitrypsin and of α 2-macroglobulin in human blood serum (plasma) in normal state and under some pathological conditions. *Problems of Medical Chemistry*, 1979, Vol. 25, no. 4, pp. 494-499. (In Russ.)
11. Otman I.N., Zozulya S.A., Chukanova A.S., Nadareishvili G.G., Simonov A.N., Gusev E.I., Klyushnik T.P. Immunological predictors of acute post-stroke period. *S. Korsakov Journal of Neurology and Psychiatry*, 2019, Vol. 119, no. 8, Iss. 2, pp. 39-45. (In Russ.)
12. Zozulya S.A., Otman I.N., Oleichik I.V., Anikhovskaya I.A., Yakovlev M.Yu., Klyushnik T.P. Conjugacy between processes of systemic inflammation and systemic endotoxemia in endogenous psychoses. *Siberian Herald of Psychiatry and Addiction Psychiatry*, 2020, Vol. 3, no. 108, pp. 17-27. (In Russ.)

Авторы:

Андросова Л.В. — к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории нейроиммунологии ФГБНУ «Научный центр психического здоровья», Москва, Россия

Симашикова Н.В. — д.м.н., профессор, заведующая отделом детской психиатрии ФГБНУ «Научный центр психического здоровья», Москва, Россия

Шушпанова О.В. — научный сотрудник отдела детской психиатрии ФГБНУ «Научный центр психического здоровья», Москва, Россия

Отман И.Н. — к.б.н., научный сотрудник лаборатории нейроиммунологии, ФГБНУ «Научный центр психического здоровья», Москва, Россия

Зозуля С.А. — к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории нейроиммунологии ФГБНУ «Научный центр психического здоровья», Москва, Россия

Шушпанова Т.В. — к.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории клинической психонейроиммунологии и нейробиологии, Научно-исследовательский институт психического здоровья ФГБНУ «Томский научный исследовательский медицинский центр Российской Академии наук», г. Томск, Россия

Клюшник Т.П. — д.м.н., профессор, заведующая лабораторией нейроиммунологии, директор ФГБНУ «Научный центр психического здоровья», Москва, Россия

Authors:

Androsova L.V., PhD (Biology), Leading Research Associate, Laboratory of Neuroimmunology, Mental Health Research Centre, Moscow, Russian Federation

Simashkova N.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Child Psychiatry, Mental Health Research Centre, Moscow, Russian Federation

Shushpanova O.V., Research Associate, Department of Child Psychiatry, Mental Health Research Centre, Moscow, Russian Federation

Otman I.N., PhD (Biology), Research Associate, Laboratory of Neuroimmunology, Mental Health Research Centre, Moscow, Russian Federation

Zozulya S.A., PhD (Biology), Leading Research Associate, Laboratory of Neuroimmunology, Mental Health Research Centre, Moscow, Russian Federation

Shushpanova T.V., PhD (Medicine), Leading Research Associate, Laboratory of Clinical Psychoneuroimmunology and Neurobiology, Research Institute of Mental Health, Tomsk Research Medical Center, Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russian Federation

Klyushnik T.P., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Laboratory of Neuroimmunology, Director, Mental Health Research Centre, Moscow, Russian Federation

Поступила 20.06.2021
Принята к печати 07.11.2021

Received 20.06.2021
Accepted 07.11.2021

XII ВСЕРОССИЙСКАЯ С МЕЖДУНАРОДНЫМ УЧАСТИЕМ ШКОЛА-КОНФЕРЕНЦИЯ ПО КЛИНИЧЕСКОЙ ИММУНОЛОГИИ «ИММУНОЛОГИЯ ДЛЯ ВРАЧЕЙ» ТЕМАТИКА «ИНФЕКЦИОННАЯ ИММУНОЛОГИЯ» 30 ЯНВАРЯ – 5 ФЕВРАЛЯ 2022 г.



XII Всероссийская с международным участием школа-конференция по клинической иммунологии «Иммунология для врачей» прошла с 30 января по 5 февраля 2022 года в заповеднике «Пушкинские Горы» Псковской области.

Школа проходила под эгидой Российской академии наук, Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Министерства здравоохранения Российской Федерации и Правительства Санкт-Петербурга в лице Комитета по здравоохранению и Комитета по науке и высшей школе, при поддержке Администрации Псковской области. Основными организаторами Школы выступили: ГНЦ – Институт иммунологии ФМБА России; Институт экспериментальной медицины; Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера; Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова; Российское научное общество иммунологов; Российская Ассоциация Аллергологов и Клинических Иммунологов; Российское цитокиновое общество; Всероссийское научно-практическое общество эпидемиологов, микробиологов и паразитологов; Ассоциация специалистов и организаций лабораторной службы «Федерация Лабораторной Медицины»; Санкт-Петербургское региональное отделение Всероссийской Общественной Организации – Ассоциации Аллергологов и Клинических Иммунологов. Председатели оргкомитета: академики РАН Черешнев Валерий Александрович (Екатеринбург) и Тотолян Арег Артемович (директор ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера (Санкт-Петербург); заместители председателя: академик РАН Хаитов Рахим Мусаевич (Москва) и академик РАН Козлов Владимир Александрович (Новосибирск); координаторы научной программы: член-корреспондент РАН Фрейдлин Ирина Соломоновна (Санкт-Петербург) и профессор Козлов Иван Генрихович (Москва).

На церемонии торжественного открытия XII Школы, после приветствий заместителя председателя Государственного комитета по здравоохранению и фармации Псковской области Рагозиной Надежды Петровны и руководителя Управления Роспотребнадзора по Псковской области Нестерука Александра Васильевича, академик РАН Тотолян Арег Артемович (Санкт-Петербург) выступил с лекцией «Луи Пастер и его последователи из России». Далее академик РАН Зверев Виталий Васильевич (Москва) выступил с лекцией «История ликвидации оспы» (памяти профессора Светланы Сергеевны Маренниковой), а академик РАН Козлов Владимир Александрович (Новосибирск) – «Тимус как инициатор «всеобщей» иммунопатологии».

В рамках первого дня после торжественного открытия прозвучали лекции членов-корреспондентов РАН: Симбирцева Андрея Семеновича (Санкт-Петербург) «Иммунопатогенез и перспективы иммунотерапии коронавирусной инфекции», Свитич Оксаны Анатольевны (Москва) «Мукозальный иммунитет при COVID-19», Суворова Александра Николаевича (Санкт-Петербург) «Бактериальные векторы для мукозальной имму-

низации против актуальных инфекций»; а также к.м.н. Дедкова Владимира Георгиевича (Санкт-Петербург) «Молекулярная изменчивость SARS-CoV-2 и ее влияние на эпидемический потенциал».

В последующие дни на Школе обсуждались вопросы: инфекционные триггеры в развитии atopических состояний (профессор Продеус А.П.); иммунодефицитные состояния (д.м.н. Корсунский И.А.); приобретенные и врожденные интерферопатии (профессор Нестерова И.В.); врожденные ошибки иммунитета в недоношенности и ранней детской смертности (профессор Тузанкина И.А.).

Оценке функциональной активности фагоцитов, базофилов в клинико-лабораторной практике были посвящены лекции профессора Хайдукова С.В. и к.б.н. Бычковой Н.В.

Наследственному ангиоотеку был посвящен в симпозиум компании TAKEDA: «Организация медицинской помощи пациентам с НАО в условиях COVID-19» (Миличкина А.М.); новая эра терапии НАО: от теории к практике. Ценность вакцинации пациентов с НАО (Кузнецова Р.Н.); клинический случай пациента с НАО: важность ранней диагностики и своевременного лечения (Слепиковская О.А.); клинический случай пациента с НАО: смена парадигмы подходов терапии (Вахнина О.А.). А компания CSL BEHRING на своем симпозиуме «Современные аспекты диагностики, терапии и организации лечебной помощи пациентам с НАО» рекомендовали: диагностику и лечение НАО (ПИД): состояние проблемы в Северо-Западном федеральном округе РФ (академик РАН Тотолян А.А.); НАО. Клинические рекомендации. Терапевтические возможности компенсации дефицита ингибитора С1-эстеразы (профессор Латышева Е.А.); педиатрических пациентов с наследственным ангиоотеком (к.м.н. Камаев А.В.); опыт применения С1-ИНГ для профилактики и лечения НАО на примере клинических случаев (к.м.н. Кузнецова Р.Н.).

Симпозиум компании «Хеликон» освещал «Современные методы протеомных и клеточных исследований в иммунологии»: изучение клеточного иммунного ответа методами EliSpot и FluoroSpot, инновации в микроскопии для прикладной иммунологии, проточная цитометрия и сортировка клеток в исследовании вирусных инфекций; с мастер-классом «Анализ растворенных иммуноглобулинов классов IgA, IgM, IgG к белкам SARS-CoV-2 методом проточной цитометрии».

На симпозиуме компании «Ферон» рассматривались «Интерфероны и их роль в терапии COVID-19 и других ОРВИ»: иммунопатогенетическая необходимость локальной и системной интерферонотерапии при COVID-19 (профессор Нестерова И.В.); интерфероны I типа как адъюванты (профессор Калюжин О.В.); COVID-19: ключевые концепции 2020-2021 гг. (академик Караулов А.В.).

На симпозиуме компании Luminex BV были рассмотрены «Серологические и клеточные подходы к исследованиям COVID-19 и других инфекционных заболеваний с использованием методов проточной цитометрии»: вирус-специфический иммунитет при исследованиях COVID-19; расширение возможностей проточной цитометрии для исследований инфекционных заболеваний при использовании методов визуализации клеток (к.б.н. Кудрявцев И.В.); проточная микроскопия — принцип метода (Марченко Г.А.).

Были проведены также семинары компанией «ЛабТэк» «Иммунологические аспекты течения и последствия COVID-19»: изменения в субпопуляционном составе лейкоцитов при остром COVID-19, SARS-CoV-2-специфические Т- и В-клетки памяти — способы выявления и динамика после острой фазы инфекционного процесса (к.б.н. Кудрявцев И.В.); иммунореабилитация пациентов после COVID-19 (к.м.н. Борисов А.Г.), и кафедрой клинической иммунологии, аллергологии и адаптологии ФНМО МИ РУДН «Пациент с рекуррентными ОРВИ в практике клинициста»: возможности иммуномодулирующей терапии часто и длительно болеющих пациентов (профессор Татаурщикова Н.С.), частые повторные ОРЗ: инфекция или аллергия? Критерии дифференциальной диагностики и выбора антигистаминовой терапии (профессор Федоскова Т.Г.).

На Школе освещались темы иммунологии COVID-19 в лекциях профессоров: Бубновой Л.Н. (Санкт-Петербург), Ганковской Л.В. (Москва), Продеуса А.П. (Москва), Нестеровой И.В. (Москва), Козлова И.Г. (Москва); темы вакцинопрофилактики: профессора Топтыгиной Т.П. (Москва), Продеуса А.П. (Москва), к.б.н. Астраханцева И.В. (Москва),

На проведении круглого стола «Практические вопросы оценки гуморального иммунитета при COVID-19» обсуждались вопросы: критерии защитного уровня постинфекционных антител, критерии защитного уровня поствакцинальных антител.

Необходимо отметить, что все лекции сопровождались очень активной дискуссией. Эти дискуссии не обошлись без острых столкновений мнений участников.

Школа вполне оправдала название Всероссийской с международным участием, т.к. в ее работе приняли участие 140 представителей из Алма-Аты (Казахстан), Минска (Беларусь), Николаева (Украина), а также из 16 регионов Российской Федерации: Абакана, Екатеринбурга, Калининграда, Краснодар, Красноярск, Ленинградской области, Москвы, Московской области, Новосибирска, Омска, Пскова, Санкт-Петербурга, Сочи, Уфы, Челябинска.

Многие участники отмечали теплую, дружескую атмосферу Школы, на которой интересная лекционная программа сочеталась с полезной культурной программой, включившей экскурсии в Михайловское, в Тригорское и в Псков. На церемонии закрытия прозвучало много слов благодарности, а также и обоснованные пожелания в адрес Оргкомитета, которые будут учтены при подготовке очередной Школы.

Оргкомитет считает своим приятным долгом от имени всех участников Школы выразить особую благодарность Администрации Псковской области и Пушкиногорского района, генеральным спонсорам — компаниям TAKEDA и «Хеликон», главному спонсору — компании «ЛабТэк», а также всем официальным спонсорам, финансовая поддержка которых сделала возможной организацию и проведение Школы.

РАХИМ МУСАЕВИЧ ХАИТОВ

(06.01.1944 – 11.03.2022)



Отечественная наука понесла тяжелую потерю. 11 марта 2022 г. скончался Рахим Мусаевич Хаитов — академик РАН, доктор медицинских наук, профессор, заслуженный деятель науки Российской Федерации, научный руководитель ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, главный аллерголог-иммунолог Минздрава России, член бюро Отделения физиологии и фундаментальной медицины РАН, заведующий кафедрой клинической аллергологии и иммунологии МГМСУ им. А.И. Евдокимова Минздрава России.

Р.М. Хаитов родился в 1944 г. в Самарканде. В 1967 г. он с отличием окончил Самаркандский медицинский институт, в стенах которого начал научную деятельность еще будучи студентом III курса. В 1968 г. защитил кандидатскую диссертацию, в 1972 г. — докторскую, которую подготовил в Москве, в Институте биофизики Минздрава СССР. В 1974 г. в отделе иммунологии Института биофизики организовал и возглавил лабораторию генетического контроля иммунного ответа.

Рахим Мусаевич стоял у истоков создания первого в нашей стране Института иммунологии Минздрава СССР. Он перешел в этот институт вместе с коллективом руководимой им лаборатории. В 1983 г. Р.М. Хаитов был назначен заместителем директора

Института иммунологии по научной работе, в 1988 г. стал директором Института иммунологии, который возглавлял до 2014 г. С 2014 г. Р.М. Хаитов был научным руководителем Института иммунологии.

В 1980 г. ему было присвоено звание профессора. В 1991 г. он был избран членом-корреспондентом РАМН, в 1997 г. — действительным членом РАМН, в 2006 г. — действительным членом РАН.

Р.М. Хаитов — ведущий специалист в области фундаментальной и клинической иммунологии и аллергологии. Работы академика Рахима Мусаевича оказали значительное влияние на развитие отечественной и мировой науки, он во многом способствовал становлению современной иммунологии в наиболее важных ее областях — фундаментальной, прикладной и общеобразовательной. Он внес значительный вклад в развитие фундаментальных и прикладных аспектов иммунологии, аллергологии, вакцинологии, иммуногенетики, биотехнологии. Он является автором и соавтором более 1000 научных работ, в том числе более 70 монографий, руководств и учебников по иммунологии, более 50 авторских свидетельств и Российских и международных патентов. Им разработаны новые методы диагностики, профилактики и лечения аллергий, опухолевых и инфекционных заболеваний, включая ВИЧ-инфекцию/СПИД, гепатиты, грипп, COVID-19 и др.

Труды Р.М. Хаитова внесли огромный вклад в развитие фундаментальных представлений об иммунной системе, в том числе о механизмах миграции и регуляции дифференцировки кроветворных стволовых клеток, описаны механизмы регуляции со стороны тимуса и гипофиз-адреналовой системы (1990-2000). Открыты неизвестные ранее медиаторы костного мозга. Рахимом Мусаевичем были обнаружены и изучены неизвестные ранее субпопуляции клеток иммунной системы (2000-2010). На протеомном и молекулярно-генетическом уровнях исследована часть генома человека, осуществляющая регуляцию иммунного ответа. С разработкой этой проблемы связаны перспективы генодиагностики и персонифицированной медицины, лечения онкологических, аутоиммунных, инфекционных и аллергических заболеваний (2010-2019). Логичным продолжением фундаментальных исследований академика Р.М. Хаитова стало создание новых принципов конструирования вакцинирующих препаратов с повышенными защитными свойствами — вакцин нового поколения. Эти препараты созданы, производятся и широко используются в клинической практике в России и за рубежом (вакцины против гриппа, брюшного тифа, дизентерии), подготовлены к производству принципиально новые препараты для лечения аллергий — вакцины против аллергических заболеваний (2010-2019). Для терапии нарушений иммунитета Р.М. Хаитовым и его сотрудниками создан ряд новых эффективных лекарств (полиоксидоний, тактивин, миелопид, иммуномакс и др.), широко используемых в практической медицине. В последние годы он активно работал в области разработки средств профилактики и лечения COVID-19.

Р.М. Хаитов вместе со своими учениками создали широкий спектр средств и изделий для диагностики инфекций, аллергий, иммунозависимых патологий, оценки и мониторинга иммунологического, аллергологического и иммуногенетического статусов людей, в т. ч. занятых на производстве с опасными условиями труда. Разработаны методы типирования генов иммунного ответа и оценки их функций. Созданы высокотехнологичные отечественные наборы реагентов и оборудование, позволяющее широко внедрять эти достижения в здравоохранение. В настоящее время эти реагенты и приборы применяются практически во всех субъектах Российской Федерации и за рубежом.

Под руководством Рахима Мусаевича проведены работы по оценке иммунного и аллергологического статуса больших контингентов взрослого и детского населения России и влияния на него неблагоприятных факторов физической, химической и биологической природы, создана иммунологическая карта страны. Были решены проблемы обеспечения иммунобезопасности работников вредных производств, предприятий по уничтожению ядерного и химического оружия, ракетного топлива, населения, проживающего вблизи таких объектов, зон экологического бедствия, ликвидаторов аварии на ЧАЭС и др.

Научная и научно-организаторская деятельность Р.М. Хаитова внесли важный вклад в становление и развитие иммунологической службы страны.

Он активно участвовал в создании первого в России Института иммунологии, который он возглавлял в течение 30 лет, и до последнего времени был научным руководителем этого института. Рахим Мусаевич долгие годы был главным аллергологом-иммунологом Минздрава России. По его инициативе на территории России была создана сеть лабораторий и центров клинической иммунологии, в номенклатуру врачебных и провизорских специальностей введена специальность «аллергология и иммунология».

С целью объединения в единое сообщество ученых и врачей-аллергологов и иммунологов в 1994 году Р.М. Хаитов создал Российскую ассоциацию аллергологов и клинических иммунологов (РААКИ), президентом которой он был до настоящего времени. Р.М. Хаитов представлял нашу страну в Совете национальных обществ Европейской академии аллергологии и клинической иммунологии (ЕААСИ) и Всемирной аллергологической организации (WAO).

Р.М. Хаитов вел большую научно-организационную работу. Он был членом рабочей группы по развитию спортивной медицины Совета при Президенте Российской Федерации по развитию физической культуры и спорта, членом Секции № 7 «Медицина и здравоохранение» Межведомственного совета по присуждению премий Правительства Российской Федерации в области науки и техники и членом этого Межведомственного совета. Р.М. Хаитов был председателем Экспертного совета РАН по иммунологии Отделения физиологических наук РАН и членом Экспертного совета РАН, членом секции № 1 КНТС Роскосмоса «Космическая биология и физиология», членом Центральной аттестационной комиссии Минздрава России, членом Научного совета Программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Фундаментальные науки — медицине», входил в состав рабочей группы экспертов по вопросам иммунопрофилактики инфекционных болезней Минздрава России, был членом Научного совета Минздрава России, экспертом РАН и Российского научного фонда. Рахим Мусаевич возглавлял диссертационный совет по специальностям «иммунология» и «клиническая иммунология, аллергология». С 1988 по 2021 гг. он был главным редактором журнала «Иммунология», с 1997 по 2019 гг. — журнала «Физиология и патология иммунной системы. Иммунофармакогенетика». Р.М. Хаитов был председателем редакционного совета «Российского аллергологического журнала», членом редколлегий ряда отечественных и международных журналов: «Вестник Академии медицинских наук», «Медицина экстремальных ситуаций», «Аллергология и иммунология», «Иммунопатология, аллергология, инфектология», «Цитокины и воспаление», «Медицинская иммунология», «Инфекция и иммунитет», «Сахарный диабет», «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение» и др., членом редколлегий информационных изданий по наукам о жизни Всероссийского института научной и технической информации РАН. Р.М. Хаитов входил в состав редакционных коллегий журналов *AIDS*, *Cellular & Molecular Immunology*, *Self/Nonself*.

Р.М. Хаитов уделял большое внимание вопросам образования и подготовки научных и медицинских кадров. Им создана большая научная школа, под его руководством выполнены и защищены 69 кандидатских диссертаций, 40 его учеников стали докторами наук. С 2005 г. Р.М. Хаитов возглавлял кафедру клинической аллергологии и иммунологии ФГБОУ ВО «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова» Минздрава России.

Выполняя обязанности главного аллерголога-иммунолога Минздрава России, Рахим Мусаевич значительное внимание уделял совершенствованию аллергологической и иммунологической службы. По его инициативе специальность «аллергология и иммунология» была введена в номенклатуру врачебных и провизорских специальностей РФ, в различных регионах страны были созданы лаборатории и центры клинической иммунологии по оценке иммунного статуса населения, профилактике и борьбе со СПИДом. Важной частью организационной работы Р.М. Хаитова была постоянная забота об улучшении условий труда врачей — аллергологов-иммунологов, а также о повышении качества специализированной медицинской помощи населению.

Научные достижения и активная научно-организационная деятельность Р.М. Хаитова были отмечены премиями и правительственными наградами. В 1973 г. ему была присуждена премия Ленинского комсомола в области науки и техники, в 1979 г. — премия им. А.А. Богомольца, в 1995 г. — премия РАН им. И.И. Мечникова. В 2001 г. Рахиму Мусаевичу была присуждена Государственная премия РФ в области науки и техники за работу «Конъюгированные полимер-субъединичные иммуногены и вакцины», в 1996 г. — премия Правительства РФ в области науки и техники «За разработку, внедрение в промышленное производство и клиническую практику нового типа иммунокорректирующих лекарственных препаратов пептидной природы: тактивина и миелопида», в 2004 г. — премия Правительства РФ в области науки и техники за учебник «Иммунология», в 2012 г. — Государственная премия в области науки и технологий «За выдающиеся достижения в научном и практическом развитии отечественной иммунологии». Р.М. Хаитов награжден почетной грамотой Президента Российской Федерации (2015).

Академик РАН Р.М. Хаитов награжден орденом Трудового Красного Знамени, орденами Почета, «За заслуги перед Отечеством» III и IV степени, а также рядом отраслевых и зарубежных наград.

Светлая память о Рахиме Мусаевиче Хаитове сохранится в сердцах его коллег, учеников, близких людей.

ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ

Статьи представляются в редакцию через систему электронного издательства (<http://mimmun.ru>) в соответствии с требованиями журнала «Медицинская иммунология» и «Инструкцией по подготовке и отправке статьи», представленной на сайте.

С 2016 г. в журнале публикуются статьи на русском и на английском языках.

В журнал принимаются следующие виды публикаций:

Оригинальная статья

Статья должна описывать результаты законченного исследования. Допускается объем статьи до 20 машинописных страниц, включая рисунки, таблицы. Статья должна содержать: 1) введение; 2) материалы и методы; 3) результаты исследований; 4) обсуждение результатов; 5) благодарности.

- **Введение** содержит обоснование цели и задач проведенного исследования.
- **Материалы и методы** могут излагаться в виде отдельных фрагментов с короткими подзаголовками. Все нетрадиционные модификации методов должны быть описаны с достаточной степенью подробности. Для всех используемых в работе реактивов, животных, клеточных культур и т. д. необходимо точно указывать производителей и/или источники получения (с названиями страны, фирмы, института).
- **Результаты** описываются в логической последовательности в виде отдельных фрагментов, разделенных подзаголовками, без элементов обсуждения, без повторения методических подробностей, без дублирования цифровых данных, приведенных в таблицах и рисунках.
- В **обсуждении** проводится детальный анализ полученных данных в сопоставлении с данными литературы, что служит обоснованием выводов и заключений авторов.
- Раздел **«Благодарности»** не является обязательным, но крайне желателен. В этом разделе авторы могут выразить признательность организации, субсидировавшей проведение исследований, коллегам, консультировавшим работу в процессе ее выполнения и/или написания, а также техническому персоналу за помощь в выполнении исследований. Благодарности за предоставление специфических реактивов или оборудования, как правило, помещаются в разделе «Материалы и методы».

Краткие сообщения

Журнал публикует небольшие по объему статьи, которые имеют безусловную новизну и значимость. Эти статьи проходят ускоренное рецензирование и публикуются в короткие сроки. Общий объем краткого сообщения ограничен 8 машинописными страницами, количество рисунков и/или таблиц не может быть более 3, а список использованных литературных источников не должен превышать 15. Титульный лист оформляется, как описано выше.

Разделы краткого сообщения аналогичны вышеописанным разделам оригинальной статьи, но не выделяются заголовками и подзаголовками, результаты могут быть изложены вместе с обсуждением.

Обзорные статьи и лекции

Обзорные статьи и лекции в основном заказываются редакцией или могут быть рекомендованы одним из членов редколлегии. Более подробную информацию о правилах оформления этих статей можно узнать в редакции

Библиографические стандарты описания цитируемых публикаций

Описание статьи из журнала:

Варюшина Е.А., Александров Г.В., Сазонова Т.А., Симбирцев А.С. Изучение влияния местного применения рекомбинантного человеческого интерлейкина-1β на репарацию язвенных повреждений слизистой оболочки желудка // Цитокины и воспаление, 2012. Т. 11, № 1. С. 64–69. [Varyushina E.A., Alexandrov G.V., Sazonova T.A., Simbirtsev A.S. Study of the effect of local application of recombinant human interleukin-1β in the repair of ulcerative lesions of gastric mucosa. *Tsitokiny i vospalenie = Cytokines and Inflammation*, 2012, Vol. 11, no. 1, pp. 64–69. (In Russ.)]

Описание статьи из книги (монографии):

Соколова Г.Н., Потапова В.Б. Клинико-патогенетические аспекты язвенной болезни желудка. М.: Анахарсис, 2009. 328 с. [Sokolova G.N., Potapova V.B. Clinical and pathogenetic aspects of gastric ulcer. Moscow: Anacharsis, 2009. 328 p.]

Примеры правильного оформления англоязычных ссылок:

Wells S.M., Kantor A.B., Stall A.M. CD43(S7) expression identifies peripheral B-cell subsets. *J. Immunol.*, 1994, Vol. 153, no. 12, pp. 5503–5515.

Goodman J.W., Parslow T.G. Immunoglobulin proteins. Basic and Clinical Immunology. Ed. Stites D.P., Terr A.I., Parslow T.G., Appleton and Lange, 1994, pp. 66–79.

Ссылки на литературные источники в тексте статьи, в рисунках и таблицах обозначаются арабскими цифрами в квадратных скобках [1, 2, 3,...]. не допускаются ссылки на диссертации, авторефераты диссертаций, публикации в сборниках, методические документы местного уровня. Количество источников не ограничено. В каждой ссылке приводятся все авторы работы. Неопубликованные статьи в список не включаются.

Обозначения, сокращения и единицы измерения

Для сложных терминов или названий, наиболее часто используемых в тексте статьи, можно ввести (в круглых скобках после первого упоминания полного названия термина) не более 3–5 нетрадиционных сокращений. Узаконенные международными номенклатурами сокращения используются в соответствующей транскрипции. Например, для термина «интерлейкин» используется сокращение «IL»,

а не русскоязычный вариант «ИЛ»; аналогично этому используются сокращения: «TNF», а не «ТНФ» или «ФНО»; «CD», а не «СД». Названия микроорганизмов приводятся в оригинальной транскрипции с использованием курсива (*E. coli*, *Streptococcus pyogenes*). Единицы измерения приводятся без точки после их сокращенного обозначения (с, ч, см, мл, мг, kDa и т.д.), регламентированного международными правилами.

Оформление иллюстративного материала

Иллюстративный материал должен быть оригинальным, то есть ранее нигде не опубликованным. Общее количество иллюстраций (таблиц и рисунков) не должно превышать восьми. При большем количестве иллюстраций их публикация оплачивается автором. Публикация цветных иллюстраций (независимо от их количества) также оплачивается автором. Весь иллюстративный материал присылается в двух экземплярах и на диске в виде отдельных файлов.

Размеры иллюстраций:

- максимальная высота — 210 мм
- максимальная ширина для 1 столбца — 82 мм, для 2 столбцов — 170 мм

Таблицы. Каждая таблица печатается на отдельном листе (в отдельном файле на диске) через 2 интервала. Нумерация таблиц дается арабскими цифрами отдельно от нумерации рисунков (графиков и фотографий). Название печатается над таблицей. Весь текст на русском языке, содержащийся в таблице, включая единицы измерения, должен быть переведен на английский язык; при этом перевод следует помещать в ячейку с соответствующим русским текстом отдельной строкой. Название таблицы и текст примечания к ней также должны быть переведены на английский язык и приведены под русским текстом с новой строки. Для пометок в таблицах следует использовать одну или несколько (*). Пояснения печатаются после соответствующего количества (*) под таблицей. Единицы измерения, при необходимости, включаются в заголовки строк или столбцов.

Рисунки (графики и фотографии). В тексте статьи названия рисунков (графиков, фотографий) и таблиц размещаются сразу после абзаца, где на них дается первая ссылка. Все рисунки нумеруются последовательно арабскими цифрами по мере их использования в тексте статьи. Названия рисунков и подписи к ним выносятся в виде списка на отдельную страницу. В списке указываются: номер рисунка, название (с большой буквы), текст примечаний (для микрофотографий должно быть указано увеличение). Подписи к рисункам даются краткие, но достаточно информативные. Названия рисунков и примечаний к ним, нарисовочные подписи, текст легенды должны быть переведены на английский язык и размещены под соответствующим текстом с новой строки. На обороте каждой иллюстрации подписывается фамилия первого автора, название статьи и порядковый номер. Для публикации в журнале принимаются только оригиналы фотографий (не ксерокопии) хорошего качества, максимально приближенные к вышеуказанным размерам.

Фотографии не должны иметь больших полей, т. е. фотографический материал должен занимать всю площадь фотографии. Рисунки могут быть представлены в графических форматах с расширением .tiff (разрешение не менее 300 dpi при 100% масштабе), .eps или .ai. Изображения, встроенные в документы Word, не принимаются. Графики и диаграммы предоставляются вместе с таблицами, на основе которых они были созданы, или с численными обозначениями показателей, отображаемых соответствующими графическими элементами (столбиками, секторами и т.п.) в виде файлов с расширениями .doc или, предпочтительнее, .xls.

Плата за публикацию статей

При соблюдении правил публикация статей в журнале «Медицинская иммунология» является бесплатной для авторов и учреждений, в которых они работают. Редакция может потребовать оплату в следующих случаях: 1) за публикацию цветных иллюстраций; 2) при большом количестве иллюстративного материала (свыше 8 иллюстраций).

Подготовка статей

Для представления статьи авторы должны подтвердить нижеследующие пункты. Статья может быть отклонена, если она им не соответствует.

- А. Направляя статью в журнал, авторы гарантируют, что поданные материалы не были ранее опубликованы полностью или по частям, в любой форме, в любом месте или на любом языке. Также авторы гарантируют, что статья не представлена для рассмотрения и публикации в другом журнале. С момента принятия статьи к печати в журнале «Медицинская иммунология» приведенный в ней материал не может быть опубликован авторами полностью или по частям в любой форме, в любом месте и на любом языке без согласования с руководством журнала. Исключением может являться: 1) предварительная или последующая публикация материалов статьи в виде тезисов или короткого резюме; 2) использование материалов статьи как части лекции или обзора; 3) использование автором представленных в журнал материалов при написании диссертации, книги или монографии. Воспроизведение всего издания или части любым способом запрещается без письменного разрешения издателей. Нарушение закона будет преследоваться в судебном порядке. Охраняется Законом РФ № 5351-1 «Об авторском праве и смежных правах» от 09.07.93 г.
- Б. Файл отправляемой статьи представлен в формате .doc, .docx, .rtf.
- В. Помимо файла со статьей, предоставлены следующие файлы:
 - 1) Файл с метаданными (при загрузке в систему ему присваивается имя «Метаданные»):
 - Фамилия, имя, отчество, ученая степень, ученое звание, должность автора, ответственного за дальнейшую переписку с редакцией (на русском и английском языках).
 - Название учреждения, где работает ответственный автор (в русском и официально принятом английском вариантах).

- Почтовый адрес для переписки с указанием почтового индекса (на русском и английском языках).
- Телефон, факс (с указанием кода страны и города), e-mail.
- Фамилия и инициалы остальных соавторов, их ученые степени, ученые звания, должности.
- Полное название статьи, направляемой в редакцию.
- Количество страниц текста, количество рисунков, количество таблиц.
- Указать, для какого раздела журнала предназначена работа: оригинальные статьи, лекции, обзоры, «точка зрения», краткие сообщения, новые иммунологические методы, случаи из практики, дневник иммунолога, книжное обозрение.
- Дата отправления работы.

2) Отсканированная копия файла с метаданными, подписанная всеми авторами (при загрузке в систему ему присваивается имя «Подписи авторов»)

3) Титульный лист (при загрузке в систему ему присваивается имя «Титульный лист»), по форме:

- название статьи (без использования каких-либо сокращений) (на русском и английском языках);
- Фамилия, имя, отчество, ученая степень, ученое звание, должность всех авторов (полностью) (на русском и английском языках);
- подразделение и учреждение, в котором выполнялась работа (если в работе участвовали авторы из разных учреждений, это должно быть отмечено звездочками) (в русском и официально принятом английском вариантах);
- сокращенное название статьи для верхнего колонтитула (не более 35 символов, включая пробелы и знаки препинания) (на русском и английском языках);
- не менее 6 ключевых слов на русском и английском языках;
- адрес для переписки с указанием телефона, номера факса и адреса e-mail.

4) Резюме (при загрузке в систему ему присваивается имя «Резюме»). Предоставляется в виде одного абзаца без ссылок и специфических сокращений. Объем — не менее 300 слов. Резюме в полном объеме представляется также в переводе на английский язык. В отдельных случаях, по решению редакционной коллегии, может быть затребован развернутый вариант резюме на английском языке.

5) Рисунки, если они есть - каждый отдельным файлом (при загрузке в систему каждому рисунку присваивается имя «Рисунок. Название рисунка (где название рисунка соответствует содержащемуся в файле рисунку. Порядковый номер рисунка)»)

6) Файл в формате .doc, .docx, rtf, с названиями рисунков

7) Таблицы, если они есть - каждая отдельным файлом (Название каждой таблицы должно быть приведено заголовком в файле с самой таблицей)

8) Файл с цитируемой литературой (при загрузке в систему ему присваивается имя «Литература»), по следующей форме: таблица из четырех столбцов (альбомная ориентация), где:

Порядковый номер ссылки	Авторы, название публикации и источника, где она опубликована, выходные данные	ФИО, название публикации и источника на английском	Полный интернет-адрес (URL) цитируемой статьи
Размещаются в таблице в алфавитном порядке, вначале русскоязычные, затем на языках с латинской графикой	Указывать по библиографическому стандарту, представленному выше	Официальное англоязычное название публикации и источника, где она опубликована - для русскоязычных статей. В редких случаях, когда не существует официальных англоязычных названий (это возможно для таких типов публикаций, как тезисы, книги и др.) - редакция просит предоставить их перевод, используя красный цвет шрифта. Для англоязычных публикаций и источников в этом столбце ставится прочерк	В том случае, если информация о статье не размещена на официальном сайте издания, допустимо использовать URL статьи со сторонних сайтов, в том числе системы www.e-library.ru

Текст должен быть набран с одинарным межстрочным интервалом; используется кегль шрифта в 14 пунктов; для выделения используется курсив, а не подчеркивание; все ссылки на иллюстрации, графики и таблицы расположены в соответствующих местах в тексте, а не в конце документа.

Текст соответствует стилистическим и библиографическим требованиям.

Если вы отправляете статью в рецензируемый раздел журнала, то вы согласны с требованиями слепого рецензирования, подробнее о котором можно узнать на сайте журнала (<http://mimmun.ru>) из рубрики **Рецензирование**, в разделе **«О Журнале»**.

Вы можете оформить подписку на журнал «Медицинская иммунология» через отделения связи: Каталог «Роспечать» — индекс 83030; Каталог «Пресса России» — индекс 42311. Подписка на электронную версию журнала на сайте www.elibrary.ru

АВТОРСКИЙ УКАЗАТЕЛЬ

Агарков Н.М.	301	Дымбрылова О.Н.	389	Маркова К.Л.	327	Соколова К.В.	263
Аксенов В.В.	301	Егорова М.О.	317	Менжинская И.В.	351	Суворов А.Н.	217
Алхутова Н.А.	317	Жижина О.Л.	317	Минасова А.А.	283	Суслова Т.Е.	389
Андреев С.Л.	389	Зайцева Н.С.	367	Михайлова В.А.	327	Татаурщикова Н.С.	395
Андреева И.И.	367	Закурская В.Я.	367	Муллагабаева С.М.	351	Топчиева Л.В.	273
Андросова Л.В.	413	Зозуля С.А.	413	Николашин С.И.	301	Тотоян Арег А.	367
Бадтиев А.К.	247	Иванов А.В.	337	Никушкина К.В.	283	Тотоян Артем А.	217
Байкенова М.Б.	263	Кайгородцева Н.В.	379	Осиков М.В.	379	Трусова О.В.	317
Батагова Ф.Э.	247	Камаев А.В.	317	Османов Р.Э.	295, 309	Уварова М.А.	337
Батурина И.Л.	283	Карпунина Т.И.	257	Отман И.Н.	413	Фабрикантов О.Л.	295, 301, 309
Безнощенко О.С.	351	Кибалина И.В.	401	Павлюк В.В.	337	Фарниева Ж.Г.	247
Бережанский П.В.	395	Клюшник Т.П.	413	Пушаева Е.Г.	247	Фефелова Е.В.	401
Бурова Л.А.	217	Ковязина Н.А.	317	Пыхова Л.Р.	283	Харитонов М.В.	367
Бычкова Н.В.	235	Кологирова И.В.	389	Ребенкова М.С.	389	Харитонов О.А.	389
Генкель В.В.	283	Корнева В.А.	273	Руруа Ф.К.	247	Цыбиков Н.Н.	401
Гетге И.Ф.	263	Кошельская О.А.	389	Савочкина А.Ю.	283	Шапошник И.И.	283
Годовалов А.П.	257	Кречетова Л.В.	351	Сафонцева Е.В.	407	Шушпанова О.В.	413
Городнова Е.А.	351	Кузнецова А.С.	283	Сельков С.А.	327	Шушпанова Т.В.	413
Давыдова Е.В.	379	Куртасова Л.М.	407	Семенова Е.В.	337	Ярмолинская М.И.	327
Данилова И.Г.	263	Лев И.В.	301	Сизякина Л.П.	367		
Долгушин И.И.	283	Лубнина Т.В.	407	Симашкова Н.В.	413		
Долгушина Н.В.	351	Любимов Д.С.	367	Скупневский С.В.	247		
Дурнева Е.И.	327	Малышева И.Е.	273	Соколов Д.И.	327		

ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

адаптивный иммунитет.	274, 284	компонент С4.	352	ревматоидный артрит.	247
активность комплемента.	352	компоненты молока.	318	респираторная инфекция.	408
активность лейкоцитарной эластазы.	413	коронавирус SARS-CoV-2.	338	рецидив.	408
аллергический ринит.	395	лабораторная диагностика гиперчувствительности.	236	сахарный диабет.	264
анти-SARS-CoV-2 антитела.	338	лейкоциты.	264	синдром старческой астении.	309
антифосфолипидные антитела.	352	лимфоциты.	247, 264	синдром сухого глаза.	302
артериальная гипертензия.	274	макрофаги.	264, 390	система комплемента.	302
атеросклероз.	284	маркеры воспаления.	413	системный иммунитет.	295
атопический дерматит.	401	мегаполис.	395	специфические IgE.	318
аутоантитела к нейроантигенам.	413	метаболический статус лимфоцитов.	247	старческая преастения.	309
аутоиммунные заболевания.	247	микровезикулы.	328	урбанизация.	395
аутоиммунные осложнения.	218	микроциркуляция.	395	фагоцитоз.	408
вегетативная нервная система.	395	миокардит.	218	хемилуминесценция.	408
воспаление.	390, 401	моноклеарные лейкоциты.	258	цитокины.	258
врожденный иммунитет.	284	моноциты.	328	шизофрения детская.	413
гликолиз.	247	неинвазивный маркер.	328	экспрессия генов.	274
гомогенат.	380	нейтрофилы.	401, 408	эндометриоз.	328
гуморальный иммунитет.	338	окислительный стресс.	247	ЭпиВакКорона.	368
дети.	408	оксазолон.	380	эпикардальная жировая ткань.	390
долгосрочный мониторинг.	338	оксигеназная активность лимфоцитов.	247	В-лимфоциты.	368
иммуноглобулин IgA.	338	патогенез.	401	COVID-19.	338, 352, 368
иммуноглобулин IgG.	338	первичная открытоугольная глаукома.	302	ENA-78/CXCL5.	401
иммуносупрессорные нейтрофилы.	284	печень.	264	Fc-связывающая активность стрептококков.	218
интерлейкины крови.	309	пищевая аллергия.	318	IFN γ	258
ишемическая болезнь сердца.	390	повреждение.	264	IgA-нефропатия.	218
кадаверин.	258	пожилые.	302, 309	IL-17.	380
капилляроскопия.	395	поствакцинальный иммунитет.	368	IL-23.	380
кардиоселективные блокаторы β -адренорецепторов.	274	постинфекционный иммунитет.	368	IL-4.	258
катаракта.	295, 309	постстрептококковый гломерулонефрит.	218	NK-клетки.	328
клетки иммунной системы.	328	путресцин.	258	NT-proBNP.	390
клеточный иммунитет.	295	реакции лекарственной гиперчувствительности.	236	T-регуляторные лимфоциты.	274, 380
кожный экссудат.	401			T-хелперы.	380
колит.	380			T-эффекторные лимфоциты.	274
компонент С3.	352			<i>Streptococcus pyogenes</i>	218

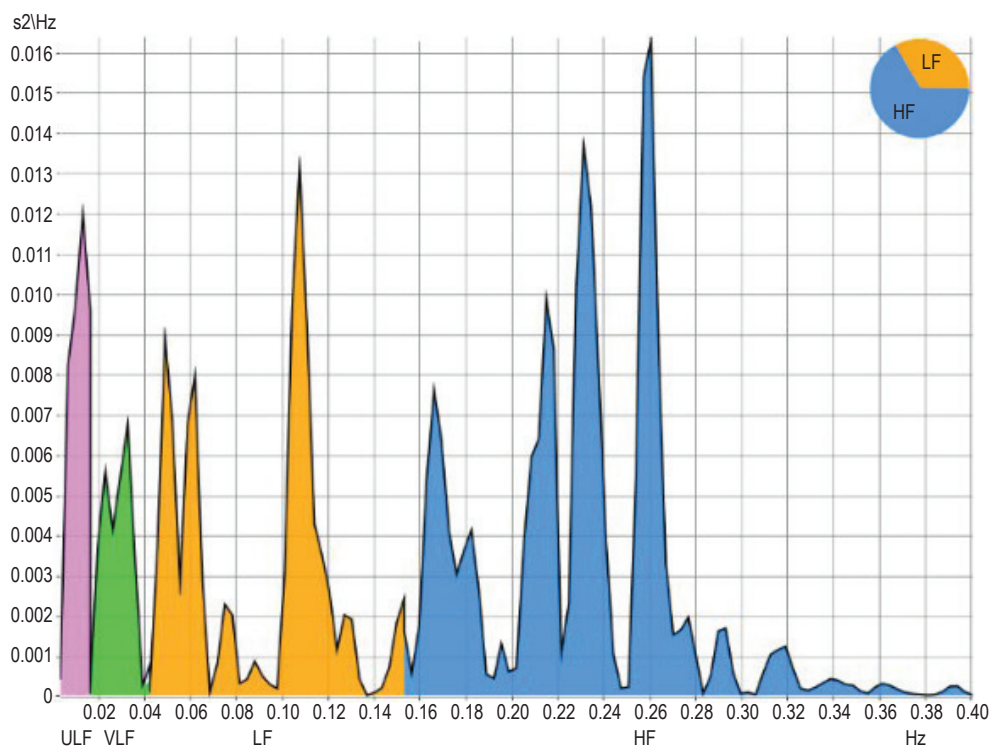


Figure 1. Spectral analysis of heart rate of children from the main group

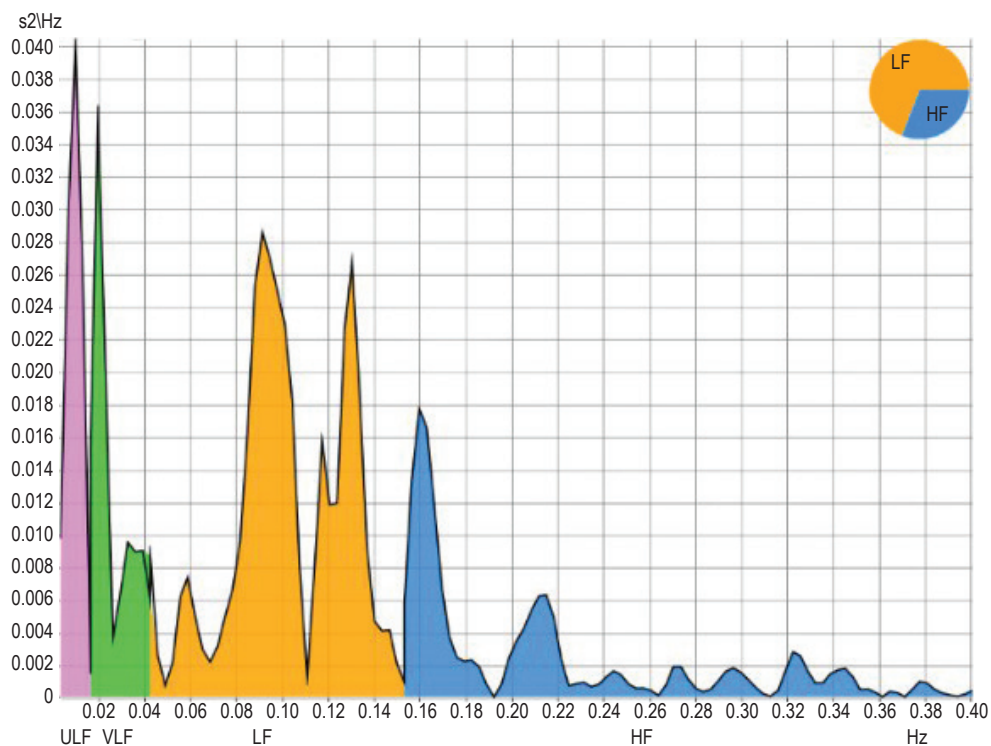


Figure 2. Spectral analysis of heart rate of children from the comparison group

ПОДПИСНОЙ ИНДЕКС:
РОСПЕЧАТЬ – 83030
ПРЕССА РОССИИ – 42311

