

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

Том 24, № 3. С. 427-652

2022

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

МЕДИЦИНСКАЯ ИММУНОЛОГИЯ

ИЛЛЮСТРАЦИИ К СТАТЬЕ «ДИНАМИКА ЛОКАЛЬНОГО ЦИТОКИНОВОГО СТАТУСА У ПАЦИЕНТОВ С СИАЛАДЕНОЗОМ ОКОЛОУШНЫХ СЛЮННЫХ ЖЕЛЕЗ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ АЛГОРИТМА ЛЕЧЕНИЯ» (АВТОРЫ: СУЛЬТИМОВА Т.Б., КОЗЛОВА М.В., ГАПОНОВ А.М., САВЛЕВИЧ Е.Л., КОЗЛОВ И.Г. [с. 527-538])

ILLUSTRATIONS FOR THE ARTICLE "DYNAMICS OF LOCAL CYTOKINE STATUS IN PATIENTS WITH PAROTID SALIVARY GLAND SIALADENOSIS DEPENDING ON THE TREATMENT ALGORITHM" (AUTHORS: SULTIMOVA T.B., KOZLOVA M.V., GAPONOV A.M., SAVLEVICH E.L., KOZLOV I.G. [pp. 527-538])

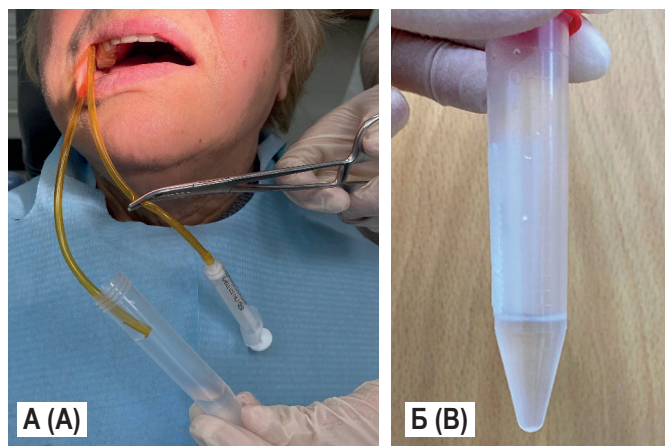


Рисунок 1. А – сиалометрия. Б – градуированная пробирка с секретом ОУСЖ

Figure 1. A, sialometry. B, graduated tube with the saliva of the parotid gland



Рисунок 2. Клиническая картина: А – пациент Л., 62 года, сухость красной каймы губ. Б – пациент Н., 58 лет, увеличенная правая ОУСЖ

Figure 2. Clinical case: A, patient L., 62 years old, dryness of the lips. B, patient N., 58 years old, enlarged right parotid gland

ИЛЛЮСТРАЦИИ К СТАТЬЕ «ОПЫТ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ НК-КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА С ФИДЕРНЫМИ КЛЕТКАМИ *IN VITRO*» (АВТОРЫ: ГЕЛЬМ Ю.В., ПАСОВА И.А., ГРИВЦОВА Л.Ю., КОНСТАНТИНОВА Т.В., МИХАЙЛОВСКИЙ Н.В., РЫБАЧУК В.А., АБАКУШИНА Е.В., ИВАНОВ С.А., КАПРИН А.Д. [с. 481-490])

ILLUSTRATIONS FOR THE ARTICLE "IN VITRO EXPERIENCE OF HUMAN NATURAL KILLER CELL CULTURE WITH FEEDER CELLS " (AUTHORS: GELM YU.V., PASOVA I.A., GRIVTSOVA L.YU., KONSTANTINOVA T.V., MIKHAYLOVSKY N.V., RYBACHUK V.A., ABAKUSHINA E.V., IVANOV S.A., KAPRIN A.D. [pp. 481-490])

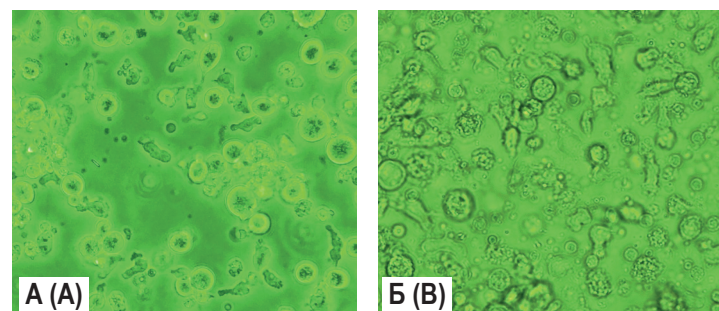


Рисунок 1. Культивирование НК-клеток с фидером на 7-е сутки
Примечание. А – клетки онкологического больного с гмK562. Б – клетки донора с K562. Увеличение ×400 раз.

Figure 1. Cultivation of NK cells with a feeder to 7th day
Note. A, cancer patient cells with gmK562. B, donor cells with K562. Magnification ×400.

ИЛЛЮСТРАЦИИ К СТАТЬЕ «ИММУННЫЙ ФЕНОТИП ТКАНЕЙ ЭКССУДАТИВНЫХ ПОРАЖЕНИЙ ПРОСТРАНСТВА РЕЙНКЕ» (АВТОРЫ: КОВАЛЕВ М.А., ДАВЫДОВА Е.В., ЗУРОЧКА А.В. [с. 507-518])

ILLUSTRATIONS FOR THE ARTICLE "IMMUNE PHENOTYPE OF TISSUES FROM EXUDATIVE LESIONS OF REINKE'S SPACE " (AUTHORS: KOVALEV M.A., DAVYDOVA E.V., ZUROCHKA A.V. [pp. 507-518])

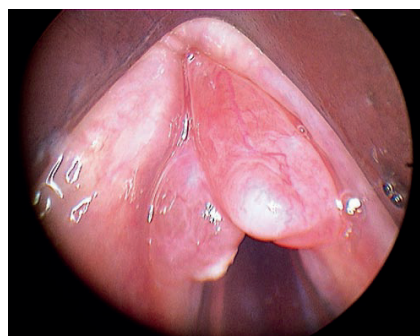


Рисунок 1. Отек Рейнке голосовых складок, двусторонний. Эндоларингоскопия

Figure 1. Reinke's edema of the vocal folds, bilateral. Endolaryngoscopy

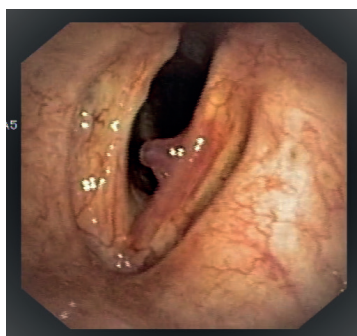


Рисунок 2. Полип правой голосовой складки. Эндоларингоскопия

Figure 2. Right vocal cord polyp. Endolaryngoscopy

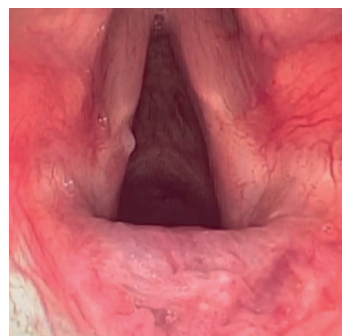


Рисунок 3. Узелки голосовых складок. Эндоларингоскопия
Примечание. Слева сформированный узелок, справа симметрично, начало формирования узелка.

Figure 3. Vocal fold nodules. Endolaryngoscopy
Note. On the left is a formed nodule, on the right is symmetrical, the beginning of nodule formation.

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

МЕДИЦИНСКАЯ ИММУНОЛОГИЯ

май-июнь

2022, том 24

№ 3

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 23.05.2022 г. Формат 60 x 90 1/8. Печать офсетная.

Усл. печ. л. 28,25. Тираж 2000 экз. (1-й завод – 1000 экз.) Заказ № 031

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

May-June

2022, volume 24

No. 3

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 23.05.2022. Print format 60 x 90 1/8. Offset printing.

Printed sheets 28.25. 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 Immunodiagnosics 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

Столбовая А.Ю., Смирнов И.В., Самойлович М.П. СТРЕСС-ИНДУЦИРОВАННЫЕ МОЛЕКУЛЫ MICA И MICB В ОНКОЛОГИИ	433
Чумоватов Н.В., Еремеев В.В., Эрашов А.Э. ВЛИЯНИЕ ТАБАЧНОГО ДЫМА И НИКОТИНА НА ИММУННЫЙ ОТВЕТ ПРИ ТУБЕРКУЛЕЗЕ И ДРУГИХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ ЛЕГКИХ	455

Оригинальные статьи

Корневский А.В., Березкина М.Э., Герт Т.Н., Синявин С.А., Сельков С.А., Соколов Д.И. ЭКСПРЕССИЯ ПОВЕРХНОСТНЫХ МОЛЕКУЛ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК: ВЛИЯНИЕ БЕЛКОВЫХ ФРАКЦИЙ ЛИЗАТА МИКРОВЕЗИКУЛ ЕСТЕСТВЕННЫХ КИЛЛЕРОВ В СИСТЕМЕ <i>IN VITRO</i>	463
Гельм Ю.В., Пасова И.А., Гривцова Л.Ю., Константинова Т.В., Михайловский Н.В., Рыбачук В.А., Абакушина Е.В., Иванов С.А., Каприн А.Д. ОПЫТ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ НК-КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА С ФИДЕРНЫМИ КЛЕТКАМИ <i>IN VITRO</i>	481
Тимганова В.П., Бочкова М.С., Шардина К.Ю., Ужвийко С.В., Гутина Е.В., Раев М.Б., Любимов А.В., Заморина С.А. ВЛИЯНИЕ КОРОТКИХ ПЕПТИДНЫХ ФРАГМЕНТОВ ТБГ НА ЦИТОКИНОВЫЙ ПРОФИЛЬ КРЫС WISTAR ПРИ АЛЛОГЕННОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ <i>IN VIVO</i>	491
Ковалев М.А., Давыдова Е.В., Зурочка А.В. ИММУННЫЙ ФЕНОТИП ТКАНЕЙ ЭКССУДАТИВНЫХ ПОРАЖЕНИЙ ПРОСТРАНСТВА РЕЙНКЕ	507
Бережанский П.В., Татаурщикова Н.С., Федоскова Т.Г., Летяева О.И., Русанова А.С., Григорьева И.Н., Камелева А.А., Добренская А.Е., Василькова А.И. РОЛЬ МОЛЕКУЛ АДГЕЗИИ L-СЕЛЕСТИН И ICAM-1 У ДЕТЕЙ С БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ	519
Сульtimoва Т.Б., Козлова М.В., Гапонов А.М., Савлевич Е.Л., Козлов И.Г. ДИНАМИКА ЛОКАЛЬНОГО ЦИТОКИНОВОГО СТАТУСА У ПАЦИЕНТОВ С СИАЛАДЕНОЗОМ ОКОЛОУШНЫХ СЛЮННЫХ ЖЕЛЕЗ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ АЛГОРИТМА ЛЕЧЕНИЯ	527
Варюшина Е.А., Безрукова Е.В., Воробейчиков Е.В., Кравченко Э.В., Сухарева Ю.В., Афитонов М.А., Симбирцев А.С. ИССЛЕДОВАНИЕ ЛОКАЛЬНОГО ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ОТВЕТА ПРИ РАЗНЫХ ФОРМАХ ХРОНИЧЕСКОГО ПОЛИПОЗНОГО РИНОСИНУСИТА	539
Нестерова И.В., Чудилова Г.А., Чапурина В.Н., Ковалева С.В., Тетерин Ю.В., Барова Н.К., Лягуша Д.Э., Тараканов В.А. КЛИНИКО-ИММУНОЛОГИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРОГРАММЫ ИММУНОТЕРАПИИ В ПОСЛЕОПЕРАЦИОННОМ ЛЕЧЕНИИ ДЕТЕЙ С РАЗЛИЧНЫМИ ФОРМАМИ ОСТРЫХ ПЕРИТОНИТОВ	553
Кудрявцев И.В., Лазарева Н.М., Баранова О.П., Серебрякова М.К., Сесь Т.П., Илькович М.М., Тотолян Арег А. ОСОБЕННОСТИ «ПОЛЯРИЗАЦИИ» Т-ХЕЛПЕРОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПРИ ОСТРОМ И ХРОНИЧЕСКОМ САРКОИДОЗЕ	573
Купцова Д.Г., Радыгина Т.В., Петричук С.В., Мурашкин Н.Н., Хотко А.А., Иванов Р.А. ОЦЕНКА КОЛИЧЕСТВА СУБПОПУЛЯЦИЙ CD4 ⁺ КЛЕТОК С ЭКСПРЕССИЕЙ ЭКТОНУКЛЕОТИДАЗ CD39 И CD73 У ДЕТЕЙ С ПСОРИАЗОМ	587
Кибалина И.В., Цыбиков Н.Н., Фелелова Е.В., Котенко А.В. ДИНАМИКА УРОВНЯ АУТОАНТИТЕЛ К КОЛЛАГЕНУ I И III ТИПОВ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ И КОЖНОМ ЭКССУДАТЕ ПРИ АТОПИЧЕСКОМ ДЕРМАТИТЕ	597
Шабалдин А.В., Синицкая А.В., Шмелевич С.А. РОЛЬ ГЕНОВ ЦИТОКИНОВ И TOLL-ПОДОБНЫХ РЕЦЕПТОРОВ В ПАТОГЕНЕЗЕ ВРОЖДЕННЫХ ПОРОКОВ СЕРДЦА	605
Давуд Али А. ВЛИЯНИЕ МУТАЦИОННЫХ ВАРИАНТОВ СПАЙКОВОГО ГЛИКОПРОТЕИНА И РНК-ЗАВИСИМОЙ РНК-ПОЛИМЕРАЗЫ (nsp12) SARS-CoV-2 НА УЧАСТКИ СТЫКОВКИ С РЕМДЕСИВИРОМ	617
Сизякина Л.П., Андреева И.И., Харитонов М.В., Зайцева Н.С., Любимов Д.С., Закурская В.Я., Тотолян Арег А. МЕХАНИЗМЫ ФОРМИРОВАНИЯ ГИБРИДНОГО ИММУНИТЕТА У ЛИЦ, ПЕРЕБОЛЕВШИХ COVID-19 И ВАКЦИНИРОВАННЫХ ПЕПТИДНЫМИ АНТИГЕНАМИ SARS-CoV-2	629

Точка зрения

Савочкина А.Ю., Пыхова Л.Р., Абрамовских О.С., Четвернина Е.А., Полторак А.Е. ИСХОДЫ СЕПСИСА: НОВЫЙ ВЗГЛЯД НА СТАРЫЕ ПРОБЛЕМЫ	641
--	-----

Юбилей	647
--------------	-----

Правила для авторов	649
---------------------------	-----

Авторский указатель	652
---------------------------	-----

Предметный указатель	652
----------------------------	-----

CONTENTS

Reviews

Stolbovaya A.Yu., Smirnov I.V., Samoilovich M.P.

STRESS-INDUCED MICA AND MICB MOLECULES IN ONCOLOGY 433

Chumovatonov N.V., Ereemeev V.V., Ergeshov A.E.

EFFECT OF TOBACCO SMOKE AND NICOTINE ON IMMUNE RESPONSE IN TUBERCULOSIS INFECTION AND OTHER LUNG DISEASES 455

Original articles

Korenevsky A.V., Berezkina M.E., Gert T.N., Sinyavin S.A., Selkov S.A., Sokolov D.I.

PHENOTYPIC AND FUNCTIONAL CHARACTERISTICS OF ENDOTHELIAL CELLS: THE *IN VITRO* EFFECTS OF PROTEIN FRACTIONS FROM THE LYSATE OF NATURAL KILLER-DERIVED MICROVESICLES 463

Gelm Yu.V., Pasova I.A., Gritsova L.Yu., Konstantinova T.V., Mikhaylovsky N.V., Rybachuk V.A., Abakushina E.V., Ivanov S.A., Kaprin A.D.

***IN VITRO* EXPERIENCE OF HUMAN NATURAL KILLER CELL CULTURE WITH FEEDER CELLS** 481

Timganova V.P., Bochkova M.S., Shardina K.Yu., Uzhviyuk S.V., Gutina E.V., Rayev M.B., Lyubimov A.V., Zamorina S.A.

EFFECT OF SHORT PSG PEPTIDE FRAGMENTS ON THE CYTOKINE PROFILE IN WISTAR RATS DURING ALLOGENEIC TRANSPLANTATION *IN VIVO* 491

Kovalev M.A., Davydova E.V., Zurochka A.V.

IMMUNE PHENOTYPE OF TISSUES FROM EXUDATIVE LESIONS OF REINKE'S SPACE 507

Berezhansky P.V., Tataurschikova N.S., Fedoskova T.G., Letyaeva O.I., Rusanova A.S., Grigorieva I.N., Kameleva A.A., Dobrenkaya A.E., Vasilkova A.I.

ROLE OF L-SELECTIN AND ICAM-1 ADHESION MOLECULES IN CHILDREN WITH ASTHMA 519

Sultimova T.B., Kozlova M.V., Gaponov A.M., Savlevich E.L., Kozlov I.G.

DYNAMICS OF LOCAL CYTOKINE STATUS IN PATIENTS WITH PAROTID SALIVARY GLAND SIALADENOSIS DEPENDING ON THE TREATMENT ALGORITHM 527

Varyushina E.A., Bezrukova E.V., Vorobeychikov E.V., Kravchenko E.V., Sukhareva Yu.V., Afritonov M.A., Simbirtsev A.S.

STUDY OF LOCAL INFLAMMATORY RESPONSE IN DIFFERENT CLINICAL FORMS OF CHRONIC POLYPOUS RHINOSINUSITIS 539

Nesterova I.V., Chudilova G.A., Chapurina V.N., Kovaleva S.V., Teterin Yu.V., Barova N.K., Lyagusha D.E., Tarakanov V.A.

CLINICAL AND IMMUNOLOGICAL EFFICACY OF IMMUNOTHERAPEUTIC PROGRAM AFTER SURGICAL TREATMENT OF CHILDREN WITH VARIOUS FORMS OF ACUTE PERITONITIS 553

Kudryavtsev I.V., Lazareva N.M., Baranova O.P., Serebriakova M.K., Ses' T.P., Ilkovich M.M., Totolian Areg A.

PERIPHERAL BLOOD T HELPER CELL SUBSETS IN LÖFGREN'S AND NON-LÖFGREN'S SYNDROME PATIENTS 573

Kuptsova D.G., Radigina T.V., Petrichuk S.V., Murashkin N.N., Khotko A.A., Ivanov R.A.

ASSESSMENT OF CD4⁺ CELLS SUBPOPULATIONS WITH THE EXPRESSING CD39 AND CD73 ECTONUCLEOTIDASES IN CHILDREN WITH PSORIASIS 587

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

TIME COURSE OF AUTOANTIBODIES TO COLLAGEN TYPE I AND III IN BLOOD SERUM AND SKIN EXUDATE IN ATOPIC DERMATITIS 597

Shabaldin A.V., Sinitskaya A.V., Shmulevich S.A.

ROLE OF CYTOKINE AND TOLL-LIKE RECEPTOR GENES IN PATHOGENESIS OF INBORN HEART DISEASE 605

Ali Adel Dawood

INFLUENCE OF SARS-CoV-2 VARIANTS' SPIKE GLYCOPROTEIN AND RNA-DEPENDENT RNA POLYMERASE (nsp12) MUTATIONS ON REMDESIVIR DOCKING RESIDUES 617

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

MECHANISMS OF FORMATION OF HYBRID IMMUNITY IN PEOPLE WHO RECOVERED FROM COVID-19 AND WERE VACCINATED WITH SARS-CoV-2 PEPTIDE ANTIGENS 629

Point of view

Savochkina A.Yu., Pykhova L.R., Abramovskikh O.S., Chetvernina E.A., Poltorak A.E.

OUTCOMES OF SEPSIS: A NEW LOOK AT OLD PROBLEMS 641

Anniversary 647

Instructions to Authors 649

Author index 652

Subject index 652

СТРЕСС-ИНДУЦИРОВАННЫЕ МОЛЕКУЛЫ MICA И MICB В ОНКОЛОГИИ

Столбовая А.Ю.^{1, 2, 3}, Смирнов И.В.^{1, 2}, Самойлович М.П.^{1, 4}

¹ ФГБУ «Российский научный центр радиологии и хирургических технологий имени академика А.М. Гранова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

² ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта», Санкт-Петербург, Россия

³ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

⁴ ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Молекулы MICA и MICB, родственные молекулам главного комплекса гистосовместимости I класса, появляются на мембранах поврежденных, трансформированных или инфицированных клеток. Эти гликопротеины связываются с NKG2D рецептором НК-клеток, что приводит к их активации и проявлению цитотоксической реакции в отношении экспрессирующих MICA и/или MICB клеток. Экспрессия лигандов NKG2D рецептора позволяет элиминировать опухолевые и поврежденные клетки. Под действием протеиназ образуются растворимые формы MICA/B белков. Связывание растворимых форм лигандов с NKG2D рецепторами вызывает их интернализацию и деградацию, что приводит к снижению активности НК-клеток.

Рост ряда опухолей желудочно-кишечного тракта, поджелудочной железы, печени, почек, легких, кожи и кровеносной системы сопровождается повышением концентрации растворимых форм MICA/B в плазме крови пациентов. Высокая концентрация этих белков ассоциирована с более низкой общей и безрецидивной выживаемостью пациентов. Растворимые формы MICA/B способствуют формированию иммуносупрессивного микроокружения опухоли, а повышение их концентрации в плазме крови можно рассматривать как индикатор избегания опухолью иммунного надзора.

Роль белков MICA/B изменяется в процессе канцерогенеза. На ранней стадии формирования опухоли эти белки способствуют активации НК-клеток и уничтожению трансформированных клеток, а на поздней стадии процесса повышенная продукция их растворимых форм приводит к снижению противоопухолевой активности НК-клеток. Стандартные методы лечения онкологических заболеваний, такие как химиотерапия, вызывают повышение плотности молекул MICA/B на клетках опухолей. Кроме того, доклинические исследования показывают, что подавление шеддинга MICA/B с помощью антител или их производных также способствует усилению противоопухолевой активности НК-клеток.

В настоящем обзоре суммированы основные сведения о биологии молекул MICA/B, их экспрессии нормальными и трансформированными клетками, рассмотрена роль этих молекул в противо-

Адрес для переписки:

Столбовая Анастасия Юрьевна
ФГБУ «Российский научный центр радиологии
и хирургических технологий имени академика
А.М. Гранова» Министерства здравоохранения РФ
197758, Россия, Санкт-Петербург, п. Песочный,
ул. Ленинградская, 70.
Тел.: 8 (921) 312-00-25.
E-mail: anastasia.stolbovaya@gmail.com

Address for correspondence:

Stolbovaya Anastasia Yu.
A. Granov Russian Research Center for Radiology
and Surgical Technologies
197758, Russian Federation, St. Petersburg, Pesochny,
Leningradskaya str., 70.
Phone: 7 (921) 312-00-25.
E-mail: anastasia.stolbovaya@gmail.com

Образец цитирования:

А.Ю. Столбовая, И.В. Смирнов, М.П. Самойлович
«Стресс-индуцированные молекулы MICA и MICB
в онкологии» // Медицинская иммунология, 2022. Т. 24,
№ 3. С. 433-454.
doi: 10.15789/1563-0625-SIM-2480
© Столбовая А.Ю. и соавт., 2022

For citation:

A. Yu. Stolbovaya, I. V. Smirnov, M. P. Samoilovich
“Stress-induced MICA and MICB molecules in oncology”, *Medical
Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2022,
Vol. 24, no. 3, pp. 433-454.
doi: 10.15789/1563-0625-SIM-2480
DOI: 10.15789/1563-0625-SIM-2480

опухолевом иммунном надзоре, а также приведены сведения о возможности использования MICA/B в диагностике и терапии онкологических заболеваний.

Ключевые слова: белки MICA/B, растворимые MICA/B, NKG2D рецептор, NK-клетки, противоопухолевый иммунитет, антитела к MICA/B

STRESS-INDUCED MICA AND MICB MOLECULES IN ONCOLOGY

Stolbovaya A.Yu.^{a,b,c}, Smirnov I.V.^{a,b}, Samoilovich M.P.^{a,d}

^a A. Granov Russian Research Center for Radiology and Surgical Technologies, St. Petersburg, Russian Federation

^b D. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology, St. Petersburg, Russian Federation

^c V. Almazov National Medical Research Center, St. Petersburg, Russian Federation

^d St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. MICA and MICB molecules, MHC class I chain-related proteins, are expressed on the membranes of damaged, transformed or infected cells. These glycoproteins bind to the NKG2D receptor of NK cells, resulting in their activation and cytotoxic response against MICA- and/or MICB-expressing cells. Expression of NKG2D receptor ligands allows the elimination of tumor and damaged cells. Soluble forms of MICA/B proteins are produced as a result of protein cleavage. Binding of soluble ligands to NKG2D receptors causes their internalization and degradation, leading to a decrease in NK cell activity.

Malignant growth of gastrointestinal tissues, pancreas, liver, kidney, lung, skin, and blood cancers is accompanied by increased concentration of soluble MICA/B in blood plasma of the patients. High concentrations of these proteins are associated with lower overall and recurrence-free survival in the patients. Soluble MICA/B contribute to immunosuppressive tumor microenvironment, and increase in their plasma contents is considered an index of tumor escape from the immune surveillance.

The role of MICA/B protein changes during carcinogenesis is also under studies. At the early stage of tumor formation, these proteins contribute to activation of NK cells and elimination of transformed cells, whereas, at the later stage of this process, the increased production of its soluble forms leads to a decrease in anti-tumor activity of NK cells. Standard cancer treatment, such as chemotherapy, is accompanied by increased density of these molecules on the tumor cells. In addition, preclinical studies show that inhibition of MICA/B shedding with antibodies or their derivatives may also promote the anti-tumor activity of NK cells.

This review summarizes basic information on the biology of MICA/B molecules, their expression by normal and transformed cells, elucidates the role of these molecules in anti-tumor immune surveillance, and provides information on the potential use of MICA/B in diagnosis and therapy of malignant diseases.

Keywords: MICA/B, soluble MICA/B, NKG2D, NK cells, antitumor immunity, anti-MICA/B antibody

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (№ 21-15-00021).

Введение

Внешние или внутренние негативные воздействия (действие ультрафиолетовой радиации, образование активных форм кислорода, механическое повреждение, ишемия и др.) приводят к нарушению метаболизма клетки и накоплению неправильно сложенных белков. Это состояние называют клеточным стрессом [31]. Аналогичные изменения могут быть вызваны активной пролиферацией клеток вследствие их опухолевой трансформации [31]. Клетки, находящиеся в состоянии стресса, распознаются и элиминируются клетками иммунной системы. Важную роль в этом процессе играют белки MICA/B, при-

надлежащие суперсемейству белков, подобных главному комплексу гистосовместимости I класса (МНС I) [8, 52]. Их экспрессия является сигналом для клеток иммунной системы, запускающим цитотоксическую реакцию в отношении стрессированных клеток [31].

Молекулы MICA/B представляют собой трансмембранные гликопротеины, являющиеся лигандами для киллинг-активирующего рецептора NKG2D. Экспрессия NKG2D рецепторов выявлена на NK-, CD8⁺T-, γδT- и NKT-клетках [38]. Система NKG2D рецептор – NKG2D лиганд позволяет клеткам иммунной системы распознавать и удалять опухолевые и стрессированные клетки вне зависимости от плотности молекул МНС I на их мембране [26].

Белки MICA/B циркулируют в крови в растворимой форме. Они образуются в результате

протеолитического отщепления (шеддинга) экстраклеточной части трансмембранных молекул под действием протеиназ семейств ADAM и MMP [76]. Рост опухолей часто сопровождается усилением шеддинга молекул MICA/B и возрастанием их концентрации в плазме крови [75]. Растворимые формы MICA/B, взаимодействуя с NKG2D рецепторами, вызывают снижение плотности рецепторов на мембране NK-клеток, и приводят к десенситизации NK-клеток [35]. Увеличение концентрации растворимых MICA/B белков в плазме крови у пациентов с онкологическими заболеваниями рассматривают в качестве индикатора ухода опухолей от иммунного надзора и высокого риска скоротечности заболевания [108].

Потенциал использования молекул MICA/B в диагностике и терапии онкологических заболеваний еще только начинает раскрываться исследователями. Показано, что уровни экспрессии этих лигандов в биоптатах опухолей, ассоциированных с пищеварительным трактом, коррелируют с прогнозом выживаемости пациентов. Повышение концентрации растворимых форм MICA/B в плазме крови также связано с негативным прогнозом общей и безрецидивной выживаемости пациентов с целым рядом онкологических заболеваний [108]. В экспериментах *in vitro* и *in vivo* показано, что повышение плотности молекул MICA/B на мембране опухолевых клеток увеличивало их чувствительность к цитотоксическому действию NK-клеток [21] даже в тех случаях, когда опухолевые клетки приобрели резистентность к Т-клеточной терапии [5].

В настоящем обзоре проанализирована биология молекул MICA/B, их участие в иммунологических процессах и потенциал использования этих белков в диагностике и терапии злокачественных новообразований.

Структура генов и белковых молекул MICA/B

Локусы генов MIC на коротком плече 6-й хромосоме были впервые описаны в 1994 году двумя группами исследователей и названы MHC class I chain-related genes (MIC) или Perth beta block transcript 11 (PERB11) [8, 52]. Описано 7 членов MIC-семейства. Однако только два из них (MICA и MICB) имеют функциональные транскрипты, остальные пять (MICC-G) являются псевдогенами. Гены MICA и MICB содержат 6 экзонов: четыре из них кодируют лидерный пептид и три домена экстраклеточной части, один — трансмембранный участок, и еще один — цитоплазматическую часть белка. Гены MIC характерны только для приматов, у других млекопитающих описаны функционально похожие, но не гомологичные им гены [7, 61].

Промоторы генов MICA и MICB содержат сайты связывания транскрипционных факторов Sp1, AP, HSF1. В промоторе MICB выявлен полиморфизм, который влияет на его транскрипционную активность [72]. Стрессовые воздействия, такие как тепловой шок, изменяют активность промоторов и, как следствие, экспрессию генов MICA/B [90]. Транскрипция генов MIC приводит к образованию мРНК длиной около 1400 п.н., на основе которых синтезируются полипептиды с молекулярной массой около 43 кДа [19].

MICA/B, аналогично молекулам MHC I, представляют собой трансмембранные гликопротеины, экстраклеточные части которых состоят из трех доменов: $\alpha 1$, $\alpha 2$ и $\alpha 3$. Однако в отличие от молекул MHC I, MICA/B не ассоциированы с $\beta 2$ -микроглобулином и не способны презентировать пептиды. Ввиду этого их относят к неклассическим молекулам MHC I класса [33]. Несмотря на гомологичное происхождение, сходство аминокислотных последовательностей молекул MICA и MICB с MHC I составляет всего около 25%. Напротив, сходство аминокислотных последовательностей MICA и MICB составляет 84% [12].

Подобно молекулам MHC I, гликопротеины MICA/B могут быть экспрессированы практически любым типом клеток. Отличие состоит в том, что структура промоторов обуславливает индуцибельный характер их экспрессии. Триггером усиления экспрессии выступают стрессирующие условия внешнего или внутреннего происхождения.

Аллельный полиморфизм генов MICA/B

Для молекул MICA/B, как и для классических молекул MHC I, характерен высокий аллельный полиморфизм. Он проявляется в однонуклеотидных заменах. У MICA/B замены распределены практически равномерно по всей длине их кодирующих последовательностей, тогда как в аллельных вариантах MHC I класса они преимущественно локализованы в участках, отвечающих за связывание презентуемых пептидов. В настоящее время описано около 100 аллелей MICA, кодирующих 79 вариантов этого белка, и около 40 аллелей MICB, кодирующих 26 вариантов этого белка. В европейской популяции преобладает 4 аллельных варианта MICA (MICA*008, MICA*009, MICA*004, MICA*002) и 1 вариант MICB (MICB*005) [12]. Аминокислотные замены располагаются как в участках, контактирующих с рецептором NKG2D, так и за их пределами. Таким образом, далеко не все замены изменяют аффинитет взаимодействия MICA/B с NKG2D рецептором [37].

В участках, кодирующих трансмембранную часть белка, аллельные варианты генов MICA содержат повторы триплета GCT, число которых

варьирует от четырех до десяти. Их обозначают как A4, A5, A6, A7, A8, A9 и A10. Некоторые из них также имеют дополнительный G нуклеотид (их обозначают как A5.1), появление которого приводит к формированию преждевременного стоп-кодона. В результате в белковых молекулах, кодируемых такими аллелями, отсутствуют цитоплазматические домены [28].

Рядом исследователей установлена взаимосвязь между полиморфизмом генов MICA и течением вирусных инфекций, а также онкологических заболеваний [19]. Так, гликопротеин цитомегаловируса человека UL142 может вызывать уменьшение плотности молекул MICA на мембране инфицированных клеток за счет взаимодействия с его цитоплазматическим доменом. В результате происходит накопление молекул MICA внутри клетки, которое влечет за собой снижение вероятности распознавания инфицированных клеток NK-клетками. В то же время белок MICA*008(A5.1), у которого отсутствует цитоплазматический домен, не взаимодействует с вирусным гликопротеином UL142, что способствует повышению резистентности хозяина к этому вирусу [13, 59, 98, 110]. Эти данные свидетельствуют о том, что некоторые аллельные варианты генов MICA могли возникнуть в результате коэволюции приматов и вирусных возбудителей. Интересно, что для пациентов с плоскоклеточным раком ротовой полости наличие этой аллели связано с более низким уровнем выживаемости и повышенным содержанием растворимой формы MICA в плазме крови [86]. Также у носителей аллели MICA*008(A5.1) отмечен повышенный риск развития гепатоцеллюлярной карциномы, вызванной вирусами гепатита В или С [15]. Таким образом, действие естественного отбора относительно отдельных аллельных вариантов генов может быть разнонаправленным, что способствует сохранению их разнообразия.

Биологическое значение полиморфной природы MICA/B до конца не выяснено. Упомянутые выше гипотезы о возникновении полиморфизма MICA в результате коэволюции человека и вирусных возбудителей, а также в результате формирования механизмов противоопухолевого иммунного надзора, могут объяснить отбор аллельных вариантов с достаточно выраженными функциональными отличиями, такими как отсутствие цитоплазматического участка. Наличие вариантов генов MICA и MICB, отличающихся друг от друга отдельными аминокислотами, они не объясняют. Возможно, молекулы MICA/B имеют неизвестные на настоящее время функции, реализация которых может объяснить адаптивное значение наблюдаемого аллельного полиморфизма. Тем

не менее разнообразие молекул MICA/B необходимо учитывать при создании диагностических систем, основанных на использовании моноклональных антител. Полиморфизм MICA также может быть причиной отторжения трансплантированных органов. При условии совпадения по HLA маркерам, несоответствие между донором и реципиентом по аллелям MICA является наиболее частой причиной отторжения трансплантата. При этом в плазме крови пациентов обнаруживают антитела к MICA, а сама реакция отторжения опосредована системой комплемента [55].

MICA и MICB — лиганды NKG2D-рецептора

Запуск цитотоксического ответа NK-клеток определяется балансом сигналов, поступающих от ингибирующих и активирующих мембранных рецепторов. При взаимодействии со здоровыми клетками, сигнал от ингибирующих рецепторов на мембране NK-киллеров преобладает, что предотвращает запуск цитотоксических механизмов [113]. Напротив, взаимодействие NK-клеток с поврежденными или трансформированными клетками приводит к сдвигу этого баланса в сторону киллинг-активирующих NKG2D-рецепторов, высвобождению перфоринов и гранзимов и продукции провоспалительных цитокинов [113].

Рецептор NKG2D (CD314) экспрессирован на мембранах CD8⁺T-, $\gamma\delta$ T-, NK-, NKT-клеток, а также на некоторых субпопуляциях CD4⁺T-лимфоцитов. Он представляет собой трансмембранный гомодимерный гликопротеин II типа, экстраклеточная часть которого содержит лектиновый домен C типа [12, 51]. Активации только NKG2D-рецепторов недостаточно для проявления клетками цитотоксических свойств и продукции цитокинов NK-клетками. Для запуска цитотоксической реакции необходима активация костимуляторных молекул 2B4 и NKp46 или наличие соответствующего цитокинового окружения: присутствия IL-2 и IL-15 [12, 51, 68]. Активированные T-клетки также способны проявлять цитотоксическую активность при связывании рецептора NKG2D с лигандами, в том числе независимо от распознавания T-клеточного рецептора [51].

Взаимодействие MICA/B с NKG2D-рецепторами происходит в их $\alpha 1$ и $\alpha 2$ доменах. Его аффинитет ($K_D = 0,8-1,0 \mu M$) оказывается выше, чем взаимодействие $\alpha\beta$ T-клеточного рецептора и MHC I с пептидом ($K_D = 1-90 \mu M$) [82].

Взаимодействие MICA/B и NKG2D-рецептора является одним из механизмов, инициирующих запуск цитотоксического ответа NK-клеток.

Экспрессия MICA и MICB в клетках

Экспрессия MICA/B может быть выявлена на большинстве типов клеток человека. В норме их мРНК обнаруживают практически во всех ор-

ТАБЛИЦА 1. ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ MICA И MICB (мРНК) В ОРГАНАХ ЧЕЛОВЕКА В НОРМЕ [78]

TABLE 1. MICA AND MICB mRNA EXPRESSION IN HUMAN BODY [78]

Система органов Organ systems	Орган Organs	мРНК MICA* mRNA MICA*	мРНК MICB* mRNA MICB*
Пищеварительная система Digestive system	Желудок Stomach	++	+
	Тощая кишка Small intestine	+++	++
	Подвздошная кишка Ileum	+++	++
	Толстый кишечник Colon	+++	+
	Прямая кишка Rectum	+++	+
	Печень Liver	+	-
	Поджелудочная железа Pancreas	+	-
Дыхательная система Respiratory system	Легкие Lungs	+++	++
Сердечно-сосудистая и мышечные системы Cardiovascular and musculoskeletal systems	Сердце Heart	++	-
	Мышцы Muscles	+	-
Иммунная система Immune system	Селезенка Spleen	-	++
Нервная система Nervous system	Мозг Brain	-	-
	Фронтальная доля Frontal lobe	-	-
	Височная доля Temporal lobe	-	-
	Теменная доля Parietal lobe	-	-
	Затылочная доля Occipital lobe	-	-
	Мозжечок Cerebellum	-	-
Выделительная система Excretory system	Мочевой пузырь Bladder	+++	++
	Почки Kidneys	+++	++
Половая система Reproductive system	Матка Uterus	+++	+
	Шейка матки Cervix	+++	+++
	Яичник Ovary	+++	+++
	Плацента Placenta	++	-
	Семенники Testicles	+++	+
	Простата Prostate	+++	++

Примечание. «+++» – выраженная, «++» – умеренная, «+» – слабая активность гена по результатам нозерн-блота, «-» – отсутствие экспрессии гена.

Note. “+++”; strong, “++”; moderate, “+”, weak gene expression by Northern-blotting; “-”, no gene expression.

ганах человека, за исключением головного мозга (табл. 1) [78]. Молекулы МІСА выявляют на мембранах клеток эпителия пищеварительной (кишечника и желудка, поджелудочной железы, печени), дыхательной (бронхи) и выделительной (мочевой пузырь, мочеточник) систем, а также мембранах трофобласта, тимического эпителия и на некоторых клетках стромы красного костного мозга [30, 33, 62]. Низкая экспрессия этих белков обнаружена на клетках иммунной системы CD4⁺T-, CD8⁺T-, В-лимфоцитах, моноцитах/макрофагах и дендритных клетках [89]. Также МІСА выявлены на мембранах культивируемых клеток эндотелия, фибробластов и кератиноцитов [112]. Исследований, посвященных экспрессии молекул МІСВ, обнаружить не удалось. Возможно, это связано с тем, что многие доступные для исследователей моноклональные антитела связывают оба этих антигена, что делает невозможным дифференциальную оценку их экспрессии.

Интересно, что в норме клетки эпителия желудка, кишечника, мочевого пузыря, мочеточников способны к накоплению молекул МІСА/В в цитоплазме [30]. Многие опухолевые клетки также проявляют это свойство, благодаря чему могут избегать иммунного надзора со стороны NK-клеток [3, 30]. Биологическое значение этой особенности для нетрансформированных клеток эпителия кишечника не ясно.

Экспрессия МІСА/В может быть индуцирована или возрастать под действием стрессирующих факторов, таких как вирусная или бактериальная инфекция [88], под действием цитокинов [14], при повреждении ДНК [58] или гипертермии [33].

Опухолевая трансформация клеток также может сопровождаться возрастанием плотности белков МІСА/В на их мембране. Культивируемые опухолевые клетки человека могут экспрессировать либо МІСА, либо МІСВ, либо оба этих лиганда одновременно (табл. 2). Преимущественно на их мембранах выявляют только МІСА. В экспериментах с трансфицированными клетками, экспрессирующими МІСВ, показано, что этот белок может накапливаться в транс-отделе аппарата Гольджи и поздних эндосомах, лишь на короткое время появляясь на цитоплазматической мембране. Интернализация МІСВ с клеточной мембраны происходит посредством клатрин-опосредованного или кавеоллин-зависимого эндоцитоза [3].

Экспрессия белковых молекул МІСА/В чаще всего повышена на клетках солидных опухолей эпителиального происхождения [35]. Тем не менее их наличие показано на культивируемых клетках меланомы, глиомы, остеосаркомы и лейкемии (табл. 2). Получены данные, свидетельствующие о том, что более дифференцированные

опухолевые клетки экспрессируют белок МІСА в большем количестве, по сравнению со слабо дифференцированными опухолевыми клетками [48].

С использованием клеток MDCK была создана модель экспрессии МІСА на поляризованных эпителиальных клетках. Молекулы, обладающие цитоплазматическим доменом, за счет наличия тандема из гидрофобных аминокислот (лейцина и валина) были локализованы преимущественно в базо-латеральной части мембраны. Напротив, молекулы МІСА*008(A5.1), лишенные цитоплазматического домена, оказывались в апикальной мембране клеток. Нарушение поляризации расположения МІСА на мембране может приводить к снижению иммунного надзора эпителиальных клеток со стороны Т- и NK-клеток, присутствующих в субэпителиальном пространстве [83].

Участие в иммунном надзоре и элиминации поврежденных и трансформированных клеток обуславливает специфику экспрессии МІСА/В. Тем не менее на множестве типов клеток в норме выявляют базовый уровень экспрессии МІСА. Функциональное значение этого явления не ясно. Полное отсутствие молекул МІСА/В на мембранах клеток головного мозга может быть связано с иммуно-привилегированным статусом этого органа. Тем не менее данные таблицы 2 свидетельствуют о том, что опухоли головного мозга могут обладать экспрессией этих гликопротеинов. Эта особенность может быть использована в диагностических целях, например, для выявления слабодифференцированных опухолевых клеток глиобластом [25].

Растворимые формы МІСА/В

Молекулы МІСА/В могут быть отщеплены с поверхности цитоплазматической мембраны (шеддинг) с образованием растворимых форм [3]. Отщепление происходит в домене $\alpha 3$ экстраклеточного участка. Шеддинг молекул МІСА могут осуществлять протеиназы ADAM9, ADAM10, ADAM17, MMP9 и MMP14. Отщепление МІСВ происходит с участием протеиназ ADAM10, ADAM15, ADAM17 и MMP9 [9, 18, 84]. В $\alpha 3$ домене экстраклеточного участка выявлена последовательность NGTYQT, мутации в которой связаны с подавлением шеддинга [93]. Эта последовательность присутствует во всех известных аллельных вариантах белков МІСА/В. С $\alpha 3$ доменом взаимодействует дисульфидная изомераза Egr5, которая образует дисульфидные связи между остатками цистеинов в $\alpha 3$ домене, что приводит к конформационным изменениям и открытию сайта отщепления [46]. Показано, что молекулы МІСА/В локализуются в богатых холестерином кавеолах мембраны при присоединении остатков пальмитиновой кислоты к двум

ТАБЛИЦА 2. ЭКСПРЕССИЯ БЕЛКОВ MICA И MICB ЛИНИЯМИ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК

TABLE 2. MICA AND MICB PROTEIN EXPRESSION BY TUMOR CELL LINES

Происхождение Tumor origin	Клетки Cells	MICA*	MICB	Ссылки References
Карциномы кишечника Intestinal carcinomas	HCT116	+		[21, 34, 63, 74, 111]
	LoVo	+		[34]
	DLD1	+		[34]
	HT-29	+		[111]
	HUTU-80	+		[111]
	Colo205	-		[66]
	CaCo2	-	+	[72]
Карциномы печени Liver carcinomas	HepG2		+	[6, 21, 44]
	Hep3B	-		[44]
	Huh7		+	[44]
Карцинома поджелудочной железы Pancreatic carcinomas	PANC-1	+		[54, 103]
	Mia-PaCa-2		+	[48]
			-	[103]
	PL12		+	[48]
	Panc89	+	+	[18]
	PancTu-1	+	+/-	[18]
	MRO87		+	[103]
	COLO-587		+/-	[103]
	CAPAN-1		+/-	[103]
	CAPAN-2		-	[103]
	MPANC-96		+	[103]
	HPAF-II		+	[103]
	BxPC3		+/-	[80]
	PANC-A	+		[56]
Аденокарцинома легкого Lung adenocarcinoma	HCC1534	+		[54]
	A549		+	[63]
		-	-	[58]
	H2228		+	[63]
Аденокарцинома молочной железы Breast adenocarcinoma	MDA-MB-231	+	+	[18, 21]
	MCF-7		+	[63]
Карцинома предстательной железы Prostate carcinoma	DU145	+		[81]
	PC3	+	+	[18, 81]
Карцинома шейки матки Cervical carcinoma	HeLa	+		[34, 60, 63, 72]
	CALO	+	+	[96]
	INBL	+	+	[96]
Карцинома почки Renal carcinoma	786-O	+		[42]
	Ketr-3	+		[42]

Таблица 2 (окончание)
Table 2 (continued)

Происхождение Tumor origin	Клетки Cells	MICA*	MICB	Ссылки References
Меланома Melanoma	A375	+		[24]
	M8	+		[60]
	MEL-JUSO	+		[54]
Остеосаркома Osteosarcoma	HOS	+	+/-	[104]
	U-2-OS	+	+/-	[63, 104]
	SaOS-2	+	+/-	[63, 104]
Промоноцитарная лейкомия Promonocytic leukemia	U937	+		[96, 111]
Моноцитарная лейкомия Monocytic leukemia	THP-1	+		[96, 111]
Острая лимфобластоидная лейкомия Acute lymphoblastoid leukemia	MOLT-4	-		[111]
Трансформированная лимфобластоидная линия Transformed lymphoblastoid lineages	BM-15	-		[111]
	Boleth	+		[111]
Хроническая миелоидная лейкомия Chronic myeloid leukemia	K562	+	+	[47, 79]
Множественная миелома Multiple myeloma	U226	+/-		[45]
Лейкемия Leukemia	NB4		+	[74]
Нейробластома Neuroblastoma	SK-N-SH	+		[21]
Астроцитома Astrocytoma	U373	+		[34]
Глиома Glioma	T98G	+	+	[27, 63]
	A172	+	+	[27]
	U87MG	+		[63]
	U251	-	-	[63]

Примечание. «+» – молекулы выявлены на мембране клеток в средней или высокой плотности; «+/-» – выявлены на мембране в очень низкой плотности;
«-» – экспрессия не выявлена; пустые ячейки – отсутствие данных; объединенные ячейки MICA/B – использованы антитела, связывающие оба белка MICA и MICB.

Note. “+”, molecules detected on the cell membrane at medium or high density; “+/-”, detected on the membrane at very low density; “-”, no expression detected; empty boxes – no data; combined boxes MICA/B – antibodies binding both MICA and MICB proteins were used.

цистеинам их цитоплазматического конца [3, 4, 11]. Туда же происходит привлечение протеазы ADAM17, осуществляющей отщепление экстраклеточной части молекул [11]. Таким образом, происходит усиление эффективности шеддинга MICA/B с мембран клеток.

Линии опухолевых клеток различного гистогенетического происхождения образуют растворимые формы MICA/B (табл. 3). Концентрация

MICB в ростовых средах опухолевых культур часто оказывается выше, чем концентрация MICA. Интересно, что клеточные культуры остеосарком практически не экспрессируют MICB на мембране, а выделяют его в растворимой форме (табл. 2 и 3).

Молекулы MICA/B могут оказываться в ростовой среде клеточных культур не только в результате протеолитического отщепления их экс-

ТАБЛИЦА 3. КОНЦЕНТРАЦИЯ (пг/мл) РАСТВОРИМЫХ ФОРМ MICA И MICB В КУЛЬТУРАЛЬНЫХ ЖИДКОСТЯХ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК

TABLE 3. PRODUCTION OF SOLUBLE MICA/B (pg/ml) BY CULTURED CELL LINES

Тип рака Cancer type	Клеточные линии Cell lines	Концентрация* (пг/мл, если не указано иное) Concentration* (pg/ml, unless otherwise specified)		Ссылки References
		sMICA	sMICB	
Карциномы кишечника Intestinal carcinomas	HCT116	38		[66]
			2000	[74]
		3000		[76]
		10 пг/10 ⁶ клеток 10 pg/10 ⁶ cells		[41]
	HT-29	1500		[76]
	CaCo2		600	[73]
Карцинома печени Liver carcinoma	HepG2	1500		[21]
Карцинома поджелудочной железы Pancreatic carcinoma	PANC-1	0 пг/10 ⁶ клеток 0 pg/10 ⁶ cells		[41]
	Panc89	490	700	[18]
	PancTu-1	490	250	[18]
Карцинома легкого Lung carcinoma	A549	100 пг/10 ⁶ клеток 100 pg/10 ⁶ cells		[41]
Аденокарцинома молочной железы Breast adenocarcinoma	MDA-MB-231	600	490	[18]
		600 пг/10 ⁶ клеток 600 pg/10 ⁶ cells		[41]
	MCF-7	10 пг/10 ⁶ клеток 10 pg/10 ⁶ cells		[41]
	SKBR3	0		[74]
Карцинома предстательной железы Prostate carcinoma	DU145	135 000	8500	[81]
	PC3	< 1000		[76]
		0	2100	[18]
Карцинома шейки матки Cervical carcinoma	HeLa	500		[76]
		10 пг/10 ⁶ клеток 10 pg/10 ⁶ cells		[41]
Остеосаркома Osteosarcoma	HOS	36	1600	[104]
	U-2-OS	35	1200	[104]
	SaOS-2	42	1700	[104]
Лимфома Lymphoma	SUDHL-6	50		[40]
	KARPAS	42		[40]
	RAJI	38		[40]
	JEKO-1	90		[40]
	MEC-1	30		[40]
Лейкемия Leukemia	NB4		400	[74]
Множественная миелома Multiple myeloma	SKO-007(J3)	< 62,5	3533	[109]
	U266	< 62,5	525	[109]
	RPMI	< 62,5	< 156	[109]
	ARP-1	< 62,5	< 156	[109]

Примечание. * – клетки культивировали в стандартных для каждой линии условиях. Пустые ячейки обозначают отсутствие данных.

Note. *, cells were cultured under standard conditions for each line. Blank boxes denote the absence of data.

траклеточной части, но и выводиться в составе экзосом. Этот механизм обнаружен у клеток рака предстательной железы PC-3 и клеток рака шейки матки HeLa [6, 18].

Усиление шеддинга MICA/V опухолевыми клетками имеет два основных последствия. Во-первых, происходит снижение плотности этих лигандов на мембране опухолевых клеток, что уменьшает вероятность их распознавания NK-клетками. Показано, что ингибирование шеддинга с помощью ингибиторов металлопротеиназ приводило к повышению плотности молекул MICA на мембране опухолевых клеток и увеличению цитотоксической активности NK-клеток в отношении них [39, 100]. Во-вторых, растворимые формы MICA/V способствуют снижению активности NK-клеток. Их связывание с NKG2D-рецепторами вызывает интернализацию рецепторов и деградацию внутри клеток. Это явление впервые было показано в экспериментах *in vitro* при добавлении рекомбинантного MICA в растворимой форме к первичной культуре NK-клеток в концентрации 100 нг/мл [35]. Это значение существенно превышало уровни растворимой формы MICA, наблюдаемые в культуральных средах опухолевых клеток (табл. 3) и периферической крови (табл. 4). Аналогичные результаты были получены при добавлении культуральной жидкости от клеток рака предстательной железы к периферическим мононуклеарным клеткам [81]. Снижение плотности NKG2D-рецепторов и уменьшение цитотоксических свойств NK-клеток было отмечено также при добавлении к ним экзосом, содержащих MICA [6, 57]. В то же время в ряде исследований не удалось подтвердить этот феномен с использованием растворимой формы MICA [18, 74]. Тем не менее у пациентов с метастазирующим раком предстательной железы, в крови которых детектировали высокую концентрацию растворимых MIC белков, наблюдают пониженный уровень NKG2D-рецепторов на мембране NK-клеток [23]. Возможно, что в опухолевом микроокружении концентрация MICA может быть существенно выше, чем в периферической крови, что вызывает локальное снижение активности NK-клеток. Исследований, посвященных уровням растворимых лигандов NKG2D-рецептора в опухолевом окружении, нам обнаружить не удалось.

Физиологическая роль растворимых форм молекул MICA/V в норме не очевидна. Возможно, они препятствуют избыточной активации NK-клеток и предотвращают повреждение здоровых участков тканей при инфекциях. Однако роль растворимых форм MICA/V при развитии

онкологических заболеваний отчетливо прослеживается. Повышение их концентрации в плазме крови многие исследователи рассматривают как признак ухода опухолевых клеток от иммунологического надзора, опосредованного клетками, несущими NKG2D-рецептор.

Изменение экспрессии MICA/V линиями опухолевых клеток

Гипоксия может вызывать снижение уровней экспрессии MICA и/или MICB на мембране опухолевых клеток, что отражается на их чувствительности к цитотоксическому действию NK-клеток. Так, помещение в гипоксические условия вызывало снижение плотности молекул MICA на мембране клеток остеосарком HOS, U-2-OS и SaOS-2. В то же время этот фактор не оказывал влияния на плотность молекул MICB, возможно ввиду низкого уровня экспрессии этого лиганда при стандартных условиях культивирования [104]. Клетки рака легкого H1339 и предстательной железы DU145 реагировали снижением плотности молекул MICA/V на мембране в ответ на гипоксию [77, 81].

Уровень экспрессии MICA/V клетками опухолей может изменяться при повышении температуры культивирования. Эта реакция обусловлена наличием в промоторных областях их генов регуляторных элементов ответа на тепловой шок [90]. Активность промоторной области гена MICB в большей степени зависит от температуры, что приводит к более выраженному усилению экспрессии именно этого гена в ответ на гипертермию [90]. Так, краткосрочная инкубация клеток HeLa, аденокарциномы толстой кишки человека Colo205 и немелкоклеточного рака легкого NCI-H23 при температуре +42 °C приводила к усилению экспрессии генов MICA и/или MICB [33, 49, 66]. Повышение плотности этих лигандов на мембране опухолевых клеток сопровождалось увеличением их чувствительности к цитотоксическому действию натуральных киллеров [66].

Рядом исследователей показано усиление экспрессии лигандов MICA/V опухолевыми клетками при повреждении их ДНК. Добавление к клеткам карциномы легкого A549 агента MG132, действие которого приводило к повреждению ДНК клеток, вызывало 10-кратное усиление транскрипции гена MICB и увеличение плотности белковых молекул на мембране клеток на 70%. В результате этих изменений клетки A549 снижали свою резистентность к цитотоксической активности натуральных киллеров [58]. Некоторые опухолевые клетки реагировали повышением уровней экспрессии MICA/V в ответ на

облучение. Таким образом вели себя клетки линий H2228, U-2-OS, U87MG, HeLa и SaOS2. Напротив, клетки линий U251, T98G, A549 и MCF7 не проявляли этого свойства [63].

Ремоделирование хроматина оказывает существенное влияние на транскриптом нормальных и трансформированных клеток. Гистоновые деацетилазы часто высоко экспрессированы в опухолевых клетках [32]. Показано, что низкая экспрессия MICA/B клетками карциномы Меркеля связана с гипoaцетилизацией гистонов в промоторах их генов [71]. Ингибиторы гистоновых деацетилаз (бутират натрия, трихостатин А, валпроат натрия) вызывали увеличение экспрессии MICA/B в клетках HeLa и HepG2 [105].

Уровни экспрессии MICA/B на опухолевых клетках изменяются под действием внешних факторов, а увеличение их плотности на мембранах опухолевых клеток сопровождается увеличением их чувствительности к цитотоксическому действию NK-клеток. Это свойство может быть использовано для повышения эффективности лечения онкологических заболеваний. Например, известно, что локальная гипертермия опухолей усиливает действие проводимой химио- или лучевой терапии. По всей видимости, этот эффект связан с усилением экспрессии молекул MHC I, белков теплового шока (Hsp) и MICA/B опухолевыми клетками, что способствовало повышению эффективности их распознавания клетками иммунной системы [101].

MICA/B как прогностические маркеры при онкологических заболеваниях

Роль белков MICA/B в канцерогенезе меняется на различных его этапах ввиду происходящих изменений в балансе между ростом опухоли и противоопухолевым иммунным ответом. В этом отношении процесс развития опухолей можно разделить на три основных этапа. На первом из них происходит эффективное распознавание и уничтожение опухолевых клеток клетками иммунной системы. На втором этапе наступает состояние равновесия между ростом опухоли и противоопухолевым ответом. И на третьем этапе наблюдается уход опухолевых клеток от иммунного контроля, что сопровождается увеличением опухолевой массы [24]. Итак, повышение экспрессии белков MICA/B опухолевыми клетками на начальном этапе роста опухоли, вызванное активной их пролиферацией и ремоделированием хроматина, способствует их распознаванию и элиминации клетками иммунной системы, прежде всего натуральными киллерами. Действие противоопухолевого иммунного ответа и гипоксия могут приводить к отбору опухолевых клеток, которые

способны накапливать внутри себя MICA/B, не позволяя им появляться на цитоплазматической мембране. Это приводит к снижению вероятности их распознавания NK-клетками. Наконец, приобретение способности опухолевых клеток к усиленному шеддингу MICA/B способствует не только их непосредственному уходу от распознавания NK-клетками, но и снижению активности последних. Эти представления во многом определяют теоретическую основу для интерпретации диагностической роли MICA/B.

Гистологические исследования биопсий опухолей показали, что молекулы MICA/B были локализованы либо только на мембране опухолевых клеток, либо только в цитоплазматических везикулах, либо и на мембране, и в цитоплазматических везикулах одновременно. При этом клетки нормальных тканей, окружающих опухоли, не экспрессировали эти маркеры [106]. Повышенная экспрессия MICA у больных колоректальной карциномой была связана с большей продолжительностью жизни пациентов с III стадией заболевания [94]. Напротив, высокая экспрессия этого маркера клетками светлоклеточной карциномы почки была связана с низкой выживаемостью пациентов [106]. Экспрессия MICA/B на хорошо дифференцированных опухолевых клетках желудка на ранних стадиях ассоциирована с положительным прогнозом. На поздних стадиях этого заболевания появлялись слабо дифференцированные опухолевые клетки, которые в меньшей степени экспрессировали эти белки. При достижении опухолью размеров более 5 см, экспрессия MICA/B была связана с негативным прогнозом, по сравнению с опухолями меньшего размера [70].

Мета-анализ данных о клинической значимости экспрессии молекул MICA/B клетками опухолей различного гистогенеза показал отсутствие однозначной взаимосвязи между этим признаком и прогнозом выживаемости онкологических пациентов в целом. Высокая прогностическая значимость этого параметра отмечена для пациентов с опухолями, происходящими из органов пищеварительной системы, тогда как для пациентов с другими нозологиями она была существенно ниже. Причиной низкой прогностической значимости может быть утрата взаимосвязи между уровнями экспрессии лигандов опухолевыми клетками и вероятностью их элиминации вследствие отсутствия лимфоцитарной инфильтрации тканей или внутриклеточной локализации MICA/B. Эти факторы затрудняют однозначную интерпретацию результатов оценки

экспрессии МІСА/В опухолевыми клетками на гистологических срезах [108].

Концентрация растворимых форм МІСА/В в плазме крови может значительно повышаться у пациентов с различными онкологическими заболеваниями желудочно-кишечного тракта, поджелудочной железы, печени, почек, легких и кровеносной системы (табл. 4 и 5). У пациентов с гепатоцеллюлярной карциномой среднее значение концентрации растворимого МІСА в плазме крови было в 5 раз выше по сравнению с аналогичным показателем у здоровых волонтеров. У отдельных больных уровень этого фактора был выше в 150 раз. При этом выживаемость онкологических пациентов с высоким содержанием растворимого МІСА в плазме крови была достоверно ниже, чем аналогичных пациентов с нормальным значением этого показателя [50]. Высокое содержание растворимого МІСА (более 305 пг/мл) в крови пациентов с множественной миеломой было связано с низким уровнем их общей и безрецидивной выживаемости [69]. Аналогичное исследование, проведенное на пациентах с меланомой, показало более низкую общую и безрецидивную выживаемость пациентов с высоким уровнем растворимого МІСВ в плазме крови [99].

Мета-анализ, включавший в себя 13 исследований, подтвердил статистическую достоверность взаимосвязи между повышенным уровнем растворимых МІСА/В в плазме крови и негативным прогнозом выживаемости онкологических пациентов с различными нозологиями. Наибольшую ценность данные показатели имели для опухолей, происходящих из органов пищеварительной системы (рак поджелудочной железы, гепатоцеллюлярная карцинома, плоскоклеточный рак полости рта), меланомы, множественной миеломы и немелкоклеточного рака легких. Стоит отметить, что пороговый уровень растворимого МІСА, при котором исследователи прогнозировали неблагоприятный исход, варьировал в пределах от 50 пг/мл до 1000 пг/мл при различных нозологиях [108].

Некоторые исследователи рассматривают определение уровней экспрессии МІСА/В опухолевыми клетками или концентрации их растворимых форм в плазме крови как способ мониторинга эффективности противоопухолевой терапии. У четырех из шести пациентов с В-клеточными лимфомами после завершения курса химиотерапии или иммунохимиотерапии с применением ритуксимаба отмечено снижение концентрации растворимой формы МІСА в плазме крови, что коррелировало с эффективностью лечения [2]. У пациентов с аденокарциномой

поджелудочной железы после резекции опухоли отмечено уменьшение концентрации растворимого МІСА в плазме крови. Низкое значение этого параметра (меньше 290 пг/мл) было ассоциировано с более благоприятным исходом оперативного вмешательства [23].

Высказано предложение по использованию оценки интенсивности продукции растворимой формы МІСА опухолевыми клетками для прогнозирования эффективности вакцинотерапии онкологических заболеваний. Аутологичные клетки меланомы, используемые для создания противоопухолевых вакцин, продуцировали растворимую форму МІСА в процессе их культивирования. Показано наличие обратной взаимосвязи между интенсивностью накопления растворимого МІСА в ростовой среде таких клеток и последующей эффективностью вакцинотерапии [1].

Получены свидетельства, указывающие на то, что определение уровней экспрессии МІСА/В опухолевыми клетками на гистологических срезах биопсий, а также концентраций их растворимых форм в плазме крови может быть использовано для прогноза эффективности терапии, основанной на НК-клетках. Низкие уровни экспрессии этих лигандов на мембранах опухолевых клеток или высокая концентрация растворимой формы МІСА в плазме крови, приводили к снижению активности НК-клеток, которые введены пациентам, и ухудшению их ответа на терапию [16, 17, 39].

Иммуногистохимические исследования экспрессии МІСА/В на биопсийном материале и определение концентраций растворимых форм этих лигандов в периферической крови могут предоставлять ценную информацию, необходимую для выбора корректной тактики лечения пациентов на различных стадиях онкологического процесса. В то же время следует отметить, что изменения в экспрессии белков МІСА/В не являются специфической чертой канцерогенеза и могут быть вызваны рядом других факторов (вирусные заболевания, бактериальные инфекции, хроническое воспаление и т.д.). Ввиду этого оценка экспрессии МІСА/В и концентраций их растворимых форм в плазме крови не могут претендовать на роль самостоятельных прогностических маркеров для онкологических заболеваний. Тем не менее они могут быть успешно использованы в комбинации с другими диагностическими методами, позволяющими провести оценку состояния пациентов.

Потенциал использования МІСА/В и антител к ним в противоопухолевой терапии

Усиления противоопухолевой активности НК-клеток можно достичь путем повышения плотности молекул МІСА/В на мембране опухолевых

ТАБЛИЦА 4. КОНЦЕНТРАЦИЯ (пг/мл) РАСТВОРИМОГО MICA В КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С ОНКОЛОГИЧЕСКИМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ

TABLE 4. SOLUBLE MICA LEVELS (pg/ml) IN BLOOD OF CANCER PATIENTS

Система органов Organ systems	Злокачественное новообразование Cancer	Пациенты Patients		Здоровые доноры Healthy Control		p***	Ссылки References
		N*	C**	N*	C**		
Пищеварительная система Digestive system	Аденокарцинома желудка Gastric adenocarcinoma	24	42	18	22	0,05	[107]
		7	5500	12	800		[76]
	Аденокарцинома поджелудочной железы Pancreatic adenocarcinoma	81	(321,3)	43	≤ 10	0,05	[23]
		61	1107 (228)	26	211 (30)	0,002	[103]
		35	40	10	50		[20]
		459	(58,5)	143	(43,1)	≤ 0,05	[65]
	HBV-гепатоцеллюлярная карцинома HBV-hepatocellular carcinoma	176	54,1	60	9,6	0,000004	[50]
	Гепатоцеллюлярная карцинома Hepatocellular carcinoma	60	(950)				[53]
	Чешуйчатая карцинома полости рта Oral squamous carcinoma	113	50,2	20	34,2	NS	[87]
	Карцинома толстого кишечника Colon carcinoma	7	5500	12	800		[76]
	Карцинома прямой кишки Rectum carcinoma	10	6500	12	800		[76]
Дыхательная система Respiratory system	Немелкоклеточный рак легкого Non-small cell lung cancer	207	143,5	207	32,4	0,01	[91]
Выделительная система Excretory system	Карцинома почки Renal carcinoma	30	198,6		0		[42]

Таблица 4 (окончание)
Table 4 (continued)

Система органов Organ systems	Злокачественное новообразование Cancer	Пациенты Patients		Здоровые доноры Healthy Control		p***	Ссылки References
		N*	C**	N*	C**		
Кровь Blood	Острый миелоидный лейкоз Acute myeloid leukemia	14	335	9	34		[73]
	Острый лимфобластоидный лейкоз Acute lymphoblastoid leukemia	2	435	9	34		[73]
	Хронический миелоидный лейкоз Chronic myeloid leukemia	4	409	9	34		[73]
	Лимфобластная неходжкинская лимфома Lymphoblastic non-Hodgkin's lymphoma	1	924	9	34		[73]
	Множественная миелома Multiple myeloma	40	(1980)			0,001	[45]
		97	429	43	230	0,0001	[70]
Кожа Skin	Меланома Melanoma	108	257,4	50	90,3	0,0005	[67]

Примечание. * – количество пациентов или здоровых доноров в исследовании. ** – приведены значения средних или медианы (указаны в скобках). Пустые ячейки обозначают отсутствие данных. *** – р-значение. Уровень статистической значимости различий. NS – отсутствие значимых различий.

Note. *, number of patients or healthy donors in the study. **, mean values or medians (in parenthesis) are represented. Blank boxes indicate no data. ***, p-value. The level of statistical significance of the differences. NS, no significant differences.

клеток. Стандартные методы терапии онкологических заболеваний, такие как химиотерапия или облучение, вызывают повреждение опухолевых клеток, что может приводить к усилению экспрессии MICA/B и других лигандов NKG2D-рецептора на их мембранах. Этот механизм иммунного усиления эффективности темозоломида и облучения в отношении различных клеток глиобластом показан в экспериментах *in vitro* и *in vivo* [95]. Получены сведения об увеличении экспрессии лигандов NKG2D-рецептора, в том числе MICA и MICB, на опухолевых клетках эпителиального происхождения или меланомы при воздействии цисплатина [64], доцетакселя [22] и дакарбазина [36]. Однако эффективность распознавания опухолевых клеток NK-клетками может снижаться вследствие удаления MICA/B с мембраны посредством шеддинга.

Наиболее прямым подходом к увеличению плотности MICA/B на мембранах опухолевых клеток является комбинированное применение ингибиторов гистоновых деацетилаз и ингибиторов металлопротеиназ. Деацетилазы способство-

вали усилению экспрессии генов, кодирующих MICA/B, а ингибиторы металлопротеиназ замедляли их шеддинг с мембран опухолевых клеток. Этот подход действительно приводил к повышению плотности молекул MICA/B на мембране опухолевых клеток и способствовал замедлению их роста у мышей, которым переносили активированные цитокинами натуральные киллеры человека [39, 100].

Подавление шеддинга посредством низкомолекулярных ингибиторов протеиназ представляется затруднительным ввиду их большого количества и разнообразия. Учитывая тот факт, что отщепление экстраклеточных участков происходит внутри $\alpha 3$ доменов, имеющих высокое сходство у молекул MICA/B области, авторы исследования предложили применять для этих целей моноклональные антитела. С использованием рекомбинантного $\alpha 3$ домена MICA в качестве иммуногена, было получено три антитела, способных связываться как с MICA, так и с MICB, и ингибировать их шеддинг. Показано, что введение этих реагентов мышам замедляло

ТАБЛИЦА 5. КОНЦЕНТРАЦИЯ (пг/мл) РАСТВОРИМОГО MICB В ПЛАЗМЕ КРОВИ ПАЦИЕНТОВ ПРИ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ

TABLE 5. SOLUBLE MICB LEVELS (pg/ml) IN BLOOD OF CANCER PATIENTS

Система органов Organ systems	Злокачественное новообразование Cancer	Пациенты Patients		Здоровые доноры Healthy control		p***	Ссылки References
		N*	C**	N*	C**		
Пищеварительная система Digestive system	Аденокарцинома желудка Gastric adenocarcinoma	24	40	18	18	0,05	[107]
		14	(360)		< 270		[74]
	Карцинома толстого кишечника Colon carcinoma	14	(340)		< 270		[74]
	Чешуйчатая карцинома полости рта Oral squamous carcinoma	60	23,6	50	21,2	NS	[85]
Кровь Blood	Острый миелоидный лейкоз Acute myeloid leukemia	14	121	9	10		[73]
	Острый лимфобластоидный лейкоз Acute lymphoblastoid leukemia	2	185	9	10		[73]
	Хронический миелоидный лейкоз Chronic myeloid leukemia	4	207	9	10		[73]
	Лимфобластная неходжкинская лимфома Lymphoblastic non-Hodgkin's lymphoma	1	288	9	10		[73]
Кожа Skin	Меланома Melanoma	125	8600	30	6270	0,0005	[99]

Примечание. См. примечание к таблице 4.

Note. As for Table 4.

прогрессию опухолей, экспрессирующих MICA человека [21]. Несмотря на то, что в геноме грызунов отсутствуют гены MIC, NK-клетки мыши оказались способны распознавать опухолевые клетки, несущие на мембране MICA/B человека, благодаря консервативной структуре NKG2D-рецепторов. Другая группа исследователей независимо создала панель моноклональных антител к MICA/B и также обнаружила среди них реагенты, способные ингибировать шеддинг этих молекул. Они подтвердили наличие у этих антител способности к стимулированию противоопухолевой активности NK-клеток *in vitro* и *in vivo* [54].

В экспериментах на гуманизированных мышах показано, что моноклональные антитела, ингибирующие шеддинг MICA/B, в комбинации с ингибитором гистоновых деацетилаз, были способны усиливать цитотоксическую активность NK-клеток в отношении опухолевых клеток, устойчивых к Т-клеточному ответу [5].

На момент подготовки настоящей публикации анонсировано начало первой фазы клинического испытания (NCT05117476) препарата CLN-619 (Cullinan oncology, США), представляющего гуманизированное моноклонально антитело к MICA/B. Предполагается изучение его терапев-

тического действия на пациентах с солидными опухолями на поздней стадии в формате монотерапии или в комбинации с пембролизумабом.

Исследование эффекта вакцинотерапии на примере пациентки с меланомой показало, что появление антител к МІСА, в результате проведенной вакцинотерапии, сопровождалось снижением уровня растворимой формы этого антигена в циркуляции и усилением реактивности НК-клеток пациентов за счет восстановления экспрессии NKG2D-рецептора на мембранах до нормального уровня [43]. Похожие результаты были получены с использованием экспериментальной модели меланомы. Комбинированная терапия, направленная против PD-L1 и растворимой формы МІСА, более эффективно подавляла рост опухолей по сравнению с односторонними методами [10]. Эти результаты дают основания полагать, что индукция появления антител к МІСА/В или введение моноклональных антител к этим антигенам может иметь позитивный эффект для пациентов с онкологическими заболеваниями, получающими традиционную терапию.

Еще один подход к увеличению плотности МІС лигандов на мембране опухолевых клеток предполагает использование фьюжн-белков, состоящих из экстраклеточной части МІСА и антигенсвязывающей части моноклональных антител, специфичных к мембранным маркерам опухолевых клеток. Подобные химерные молекулы были созданы на основе антител к CD24, CEA, HER, CD20 и VEGFR2. Их добавление в ростовую среду усиливало противоопухолевую активность натуральных киллеров в отношении опухолевых клеток [29, 92, 102].

Приведенные данные свидетельствуют о возрастающем интересе к молекулам МІСА/В в качестве мишеней для терапии злокачественных

новообразований. Можно ожидать, что подходы, основанные на использовании специфичных антител к молекулам МІСА/В, будут иметь ряд преимуществ по сравнению со стандартными методами терапии на основе антител. Во-первых, один и тот же препарат может быть применен к широкому спектру онкологических заболеваний ввиду того, что экспрессия МІСА/В характерна для опухолей различного гистогенеза. Во-вторых, антитела к МІС могут усиливать противоопухолевый иммунный ответ как за счет увеличения плотности МІСА/В на мембранах опухолевых клеток, так и благодаря снижению уровня растворимых форм этих белков в циркуляции и восстановления активности НК-клеток. В-третьих, связывание антител с опухолевыми клетками также может стимулировать НК-клетки к активации через их Fc-рецепторы, т.е. активировать механизмы антитело-опосредованного лизиса клеток.

Заключение

Стресс-индуцируемые молекулы МІСА/В играют двойственную роль в противоопухолевом надзоре. Концентрация МІСА/В белков в крови может быть использована в качестве показателя для уточнения прогноза течения онкологического заболевания и мониторинга эффективности терапии.

Антитела к МІСА/В имеют широкий спектр применения и могут быть использованы как для исследования биологии НК-клеток, так и в диагностических целях. На настоящее время нет опубликованных данных о завершенных клинических испытаниях антител к МІСА/В на пациентах с онкологическими заболеваниями. Тем не менее результаты доклинических исследований позволяют рассматривать их и как потенциальные терапевтические средства.

Список литературы / References

1. Данилова А.Б., Данилов А.О., Фахрутдинова О.Л., Балдуева И.А., Моисеенко В.М. Иммунохимический анализ продукции МІС А опухолевыми клетками *in vitro* и *in vivo* в контексте создания и применения противоопухолевых вакцин // Вопросы онкологии, 2010. Т. 56, № 5. С. 576-582. [Danilova A.B., Danilov A.O., Fahrutdinova O.L., Baldueva I.A., Moiseenko V.M. Immunochemical assay of MIC A production by tumor cells *in vitro* and *in vivo* as a component of antitumor vaccine development. *Voprosy onkologii = Problems of Oncology*, 2010, Vol. 56, no. 5, pp. 576-582. (In Russ.)]
2. Клинова А.В., Кузьмина Е.Г., Абакушина Е.В., Каневский Л.М., Неприна Г.С., Павлов В.В., Коваленко Е.И. Циркулирующий белок МІСА у больных злокачественными лимфомами // Медицинская иммунология, 2016. Т. 18, № 2. С.151-162. [Klinkova A.V., Kuzmina E.G., Abakushina E.V., Kanevskiy L.M., Neprina G.S., Pavlov V.V., Kovalenko E.I. Circulating mica protein in patients with malignant lymphomas. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2016, Vol. 18, no. 2, pp. 151-162. (In Russ.)] doi:10.15789/1563-0625-2016-2-151-162.
3. Agüera-González S., Boutet P., Reyburn H.T., Valés-Gómez M. Brief residence at the plasma membrane of the MHC class I-related chain B is due to clathrin-mediated cholesterol-dependent endocytosis and shedding. *J. Immunol.*, 2009, Vol. 182, no. 8, pp. 4800-4808.

4. Agüera-González S., Gross C.C., Fernández-Messina L., Ashiru O., Estes G., Hang H.C., Reyburn H.T., Long E.O., Valés-Gómez M. Palmitoylation of MICA, a ligand for NKG2D, mediates its recruitment to membrane microdomains and promotes its shedding. *Eur. J. Immunol.*, 2011, Vol. 41, no. 12, pp. 3667-3676.
5. de Andrade F.L., Kumar S., Luoma A.M., Ito Y., Alves da Silva P.H., Pan D., Pyrdol J.W., Yoon C.H., Wucherpfennig K.W. Inhibition of MICA and MICB shedding elicits NK cell-mediated immunity against tumors resistant to cytotoxic T cells. *Cancer Immun.*, 2020, Vol. 8, no. 6, pp. 769-780.
6. Ashiru O., Boutet P., Fernández-Messina L., Agüera-González S., Skepper J.N., Valés-Gómez M., Reyburn H.T. Natural killer cell cytotoxicity is suppressed by exposure to the human NKG2D ligand MICA*008 that is shed by tumor cells in exosomes. *Cancer Res.*, 2010, Vol. 70, no. 2, pp. 481-489.
7. Bahram S. MIC genes: from genetics to biology. *Adv. Immunol.*, 2001, Vol. 76, no. 1995, pp. 1-60.
8. Bahram S., Bresnahan M., E D., Spies T. A second lineage of mammalian major histocompatibility complex class I genes. *Immunology*, 1994, Vol. 91, no. 7, pp. 6259-6263.
9. Bargostavan M.H., Eslami G., Esfandiari N., Shahemabadi A.S. MMP9 promoter polymorphism (-1562 C/T) does not affect the serum levels of soluble MICB and MICA in breast cancer. *Iran. J. Immunol.*, 2016, Vol. 13, no. 1, pp. 45-53.
10. Basher F., Dhar P., Wang X., Wainwright D.A., Zhang B., Sosman J., Ji Z., Wu J.D. Antibody targeting tumor-derived soluble NKG2D ligand sMIC reprograms NK cell homeostatic survival and function and enhances melanoma response to PD1 blockade therapy. *J. Hematol. Oncol.*, 2020, Vol. 13, no. 1, pp. 1-16.
11. Boutet P., Agüera-González S., Atkinson S., Pennington C.J., Edwards D.R., Murphy G., Reyburn H.T., Valés-Gómez M. Cutting edge: the metalloproteinase ADAM17/TNF-alpha-converting enzyme regulates proteolytic shedding of the MHC class I-related chain B protein. *J. Immunol.*, 2009, Vol. 182, pp. 49-53.
12. Carapito R., Bahram S. Genetics, genomics, and evolutionary biology of NKG2D ligands. *Immunol. Rev.*, 2015, Vol. 267, no. 1, pp. 88-116.
13. Chalupny N.J., Rein-Weston A., Dosch S., Cosman D. Down-regulation of the NKG2D ligand MICA by the human cytomegalovirus glycoprotein UL142. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2006, Vol. 346, no. 1, pp. 175-181.
14. Chauveau A., Tonnerre P., Pabois A., Gavlovsky P.J., Chatelais M., Coupel S., Charreau B. Endothelial cell activation and proliferation modulate NKG2D activity by regulating MICA expression and shedding. *J. Innate Immun.*, 2014, Vol. 6, no. 1, pp. 89-104.
15. Chen D., Gyllenstein U. Review MICA polymorphism: biology and importance in cancer. *Carcinogenesis*, 2014, Vol. 35, no. 12, pp. 2633-2642.
16. Chen Y., Lin G., Guo Z.-Q., Zhou Z.-F., He Z.-Y., Ye Y.-B. Effects of MICA expression on the prognosis of advanced non-small cell lung cancer and the efficacy of CIK therapy. *PLoS One*, 2013, Vol. 8, no. 7, e69044. doi: 10.1371/journal.pone.0069044.
17. Chen Y., Lin W.-S., Zhu W. -F., Lin J., Zhou Z.-F., Huang C.-Z., Chen G., Shi Y., Guo Z.-Q., Ye Y.-B. Tumor MICA status predicts the efficacy of immunotherapy with cytokine-induced killer cells for patients with gastric cancer. *Immunol. Res.*, 2016, Vol. 64, no. 1, pp. 251-259.
18. Chitadze G., Lettau M., Bhat J., Wesch D., Steinle A., Fürst D., Mytilineos J., Kalthoff H., Janssen O., Oberg H.H., Kabelitz D. Shedding of endogenous MHC class I-related chain molecules A and B from different human tumor entities: heterogeneous involvement of the "a disintegrin and metalloproteases" 10 and 17. *Int. J. Cancer*, 2013, Vol. 133, no. 7, pp. 1557-1566.
19. Choy M.K., Phipps M.E. MICA polymorphism: biology and importance in immunity and disease. *Trends Mol. Med.*, 2010, Vol. 16, no. 3, pp. 97-106.
20. Dambras Z., Svensson H., Joshi M., Hylander A., Naredi P., Iresjö B.M. Expression of major histocompatibility complex class I-related chain A/B (MICA/B) in pancreatic carcinoma. *Int. J. Oncol.*, 2014, Vol. 44, no. 1, pp. 99-104.
21. de Andrade L.F., Tsoucas D., Badrinath S., Ito Y., Yoon C., Yuan G.-C., Kobold S., Luoma A.M., May K.F., Franz B., Dranoff G., Pyrdol J.W., Tay R.E., Harvey C.J., Wucherpfennig K.W. Antibody-mediated inhibition of MICA and MICB shedding promotes NK cell-driven tumor immunity. *Science*, 2018, Vol. 359, no. 6383, pp. 1537-1542.
22. di Modica M., Sfondrini L., Regondi V., Varchetta S., Oliviero B., Mariani G., Bianchi G.V., Generali D., Balsari A., Triulzi T., Tagliabue E. Taxanes enhance trastuzumab-mediated ADCC on tumor cells through NKG2D-mediated NK cell recognition. *Oncotarget*, 2016, Vol. 7, no. 1, pp. 255-265.
23. Duan X., Deng L., Chen X., Lu Y., Zhang Q., Zhang K., Hu Y., Zeng J., Sun W. Clinical significance of the immunostimulatory MHC class I chain-related molecule A and NKG2D receptor on NK cells in pancreatic cancer. *Med. Oncol.*, 2011, Vol. 28, no. 2, pp. 466-474.
24. Dunn G.P., Old L.J., Schreiber R.D. The Immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity*, 2004, Vol. 21, pp. 137-148.
25. Flüh C., Chitadze G., Adamski V., Hattermann K., Synowitz M., Kabelitz D., Held-Feindt J. NKG2D ligands in glioma stem-like cells: expression in situ and in vitro. *Histochem. Cell Biol.*, 2018, Vol. 149, no. 3, pp. 219-223.

26. Frazao A., Rethacker L., Messaoudene M., Avril M.F., Toubert A., Dulphy N., Caignard A. NKG2D/NKG2-Ligand pathway offers new opportunities in cancer treatment. *Front. Immunol.*, 2019, Vol. 10, 661. doi: 10.3389/fimmu.2019.00661.
27. Friese M.A., Platten M., Lutz S.Z., Naumann U., Aulwurm S., Bischof F., Bühring H.J., Dichgans J., Rammensee H.G., Steinle A., Weller M. MICA/NKG2D-mediated immunogene therapy of experimental gliomas. *Cancer Res.*, 2003, Vol. 63, no. 24, pp. 8996-9006.
28. Frigoul A., Lefranc M.-P. MICA: Standardized IMGT allele nomenclature, polymorphisms and diseases. *Research Signpost India Recent Res. Dev. Human Genet.*, 2005, Vol. 37661, no. 3, pp. 95-145.
29. Germain C., Larbouret C., Cesson V., Donda A., Held W., Mach J.P., Pèleguin A., Robert B. MHC class I-related chain a conjugated to antitumor antibodies can sensitize tumor cells to specific lysis by natural killer cells. *Clin. Cancer Res.*, 2005, Vol. 11, no. 20, pp. 7516-7522.
30. Ghadially H., Brown L., Lloyd C., Lewis L., Lewis A., Dillon J., Sainson R., Jovanovic J., Tigue N.J., Bannister D., Bamber L., Valge-archer V., Wilkinson R.W. MHC class I chain-related protein A and B (MICA and MICB) are predominantly expressed intracellularly in tumour and normal tissue. *Br. J. Cancer*, 2017, Vol. 116, no. 9, pp. 1208-1217.
31. Gleimer M., Parham P. Stress management: MHC class I and class I-like molecules as reporters of cellular stress. *Immunity*, 2003, Vol. 19, no. 4, pp. 469-477.
32. Glozak M.A., Seto E. Histone deacetylases and cancer. *Oncogene*, 2007, Vol. 26, no. 37, pp. 5420-5432.
33. Groh V., Bahramt S., Bauer S., Herman A., Beauchamp M., Spies T. Cell stress-regulated human major histocompatibility complex class I gene expressed in gastrointestinal epithelium. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 1996, Vol. 93, no. 10, pp. 12445-12450.
34. Groh V., Rhinehart R., Heather S., Bauer S., Grabstein K.H., Spies T. Broad tumor-associated expression and recognition by tumor-derived T cells of MICA and MICB. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 1999, Vol. 96, no. 6, pp. 6879-6884.
35. Groh V., Wu J., Yee C., Spies T. Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation. *Nature*, 2002, Vol. 419, no. 6908, pp. 734-738.
36. Hervieu A., Rébé C., Végran F., Chalmin F., Bruchard M., Vabres P., Apetoh L., Ghiringhelli F., Mignot G. Dacarbazine-mediated upregulation of NKG2D ligands on tumor cells activates NK and CD8 T cells and restrains melanoma growth. *J. Invest. Dermatol.*, 2013, Vol. 133, no. 2, pp. 499-508.
37. Holmes M.A., Li P., Petersdorf E.W., Strong R.K. Structural Studies of Allelic Diversity of the MHC Class I homolog MIC-B, a stress-inducible ligand for the activating immunoreceptor NKG2D. *J. Immunol.*, 2002, Vol. 169, no. 3, pp. 1395-1400.
38. Houchins J.P., Yabe T., McSherry C., Bach F.H. DNA sequence analysis of NKG2, a family of related cDNA clones encoding type II integral membrane proteins on human natural killer cells. *J. Exp. Med.*, 1991, Vol. 173, no. 4, pp. 1017-1020.
39. Huang B., Sikorski R., Sampath P., Thorne S.H. Modulation of NKG2D-ligand cell surface expression enhances immune cell therapy of cancer. *J. Immunother.*, 2011, Vol. 34, no. 3, pp. 289-296.
40. Huergo-Zapico L., Gonzalez-Rodriguez A.P., Contesti J., Gonzalez E., López-Soto A., Fernandez-Guizan A., Acebes-Huerta A., de Los Toyos J.R., Lopez-Larrea C., Groh V., Spies T., Gonzalez S. Expression of ERp5 and GRP78 on the membrane of chronic lymphocytic leukemia cells: association with soluble MICA shedding. *Cancer Immunol. Immunother.*, 2012, Vol. 61, no. 8, pp. 1201-1210.
41. Isernhagen A., Malzahn D., Viktorova E., Elsner L., Monecke S., von Bonin F., Kilisch M., Wermuth J.M., Walther N., Balavarca Y., Stahl-Hennig C., Engelke M., Walter L., Bickeböller H., Kube D., Wulf G., Dressel R. The MICA-129 dimorphism affects NKG2D signaling and outcome of hematopoietic stem cell transplantation. *EMBO Mol. Med.*, 2015, Vol. 7, no. 11, pp. 109-123.
42. Jia H.-Y., Liu J.-L., Zhou C.-J., Kong F., Yuan M.-Z., Sun W.-D., Wang J., Liu L., Zhao J.-J., Luan Y. High expression of MICA in human kidney cancer tissue and renal cell carcinoma lines. *Asian Pac. J. Cancer Prev.*, 2014, Vol. 15, no. 4, pp. 1715-1717.
43. Jinushi M., Hodi F.S., Dranoff G. Therapy-induced antibodies to MHC class I chain-related protein A antagonize immune suppression and stimulate antitumor cytotoxicity. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 2006, Vol. 103, no. 24, pp. 9190-9195.
44. Jinushi M., Takehara T., Tatsumi T., Kanto T., Groh V., Spies T., Kimura R., Miyagi T., Mochizuki K., Sasaki Y., Hayashi N. Expression and role of MICA and MICB in human hepatocellular carcinomas and their regulation by retinoic acid. *Int. J. Cancer*, 2003, Vol. 104, no. 3, pp. 354-361.
45. Jinushi M., Vanneman M., Munshi N.C., Tai Y.-T., Prabhala R.H., Ritz J., Neuberg D., Anderson K.C., Carrasco D.R., Dranoff G. MHC class I chain-related protein A antibodies and shedding are associated with the progression of multiple myeloma. *PNAS*, 2008, Vol. 105, no. 4, pp. 1285-1290.
46. Kaiser B.K., Yim D., Chow I.T., Gonzalez S., Dai Z., Mann H.H., Strong R.K., Groh V., Spies T. Disulphide-isomerase-enabled shedding of tumour-associated NKG2D ligands. *Nature*, 2007, Vol. 447, no. 7143, pp. 482-486.

47. Kato N., Tanaka J., Sugita J., Toubai T., Miura Y., Ibata M., Syono Y., Ota S., Kondo T., Asaka M., Imamura M. Regulation of the expression of MHC class I-related chain A, B (MICA, MICB) via chromatin remodeling and its impact on the susceptibility of leukemic cells to the cytotoxicity of NKG2D-expressing cells. *Leukemia*, 2007, Vol. 21, no. 10, pp. 2103-2108.
48. Kaur K., Safaie T., Ko M.-W., Wang Y., Anahid J. ADCC against MICA/B is mediated against differentiated oral and pancreatic and not stem-like/poorly differentiated tumors by the NK cells; loss in cancer patients due to down-modulation of CD16 receptor. *Cancers*, 2021, Vol. 13, 239. doi: 10.3390/cancers13020239.
49. Kim J.Y., Son Y.O., Park S.W., Bae J.H., Joo S.C., Hyung H.K., Chung B.S., Kim S.H., Kang C.D. Increase of NKG2D ligands and sensitivity to NK cell-mediated cytotoxicity of tumor cells by heat shock and ionizing radiation. *Exp. Mol. Med.*, 2006, Vol. 38, no. 5, pp. 474-484.
50. Kumar V., Yi Lo P.H., Sawai H., Kato N., Takahashi A., Deng Z., Urabe Y., Mbarek H., Tokunaga K., Tanaka Y., Sugiyama M., Mizokami M., Muroyama R., Tateishi R., Omata M., Koike K., Tanikawa C., Kamatani N., Kubo M., Nakamura Y., Matsuda K. Soluble MICA and a MICA variation as possible prognostic biomarkers for HBV-induced hepatocellular carcinoma. *PLoS One*, 2012, Vol. 7, no. 9, e44743. doi: 10.1371/journal.pone.0044743.
51. Lanier L.L. NKG2D receptor and its ligands in host defense. *Cancer Immunol. Res.*, 2016, Vol. 118, no. 24, pp. 6072-6078.
52. Leelayuwat C., Degli-Esposti M.A., Abraham L.J., Dawkins R.L., Townend D.C. A new polymorphic and multicopy MHC gene family related to nonmammalian class I. *Immunogenetics*, 1994, Vol. 40, no. 5, pp. 339-351.
53. Li J.J., Pan K., Gu M.F., Chen M.S., Zhao J.J., Wang H., Liang X.T., Sun J.C., Xia J.C. Prognostic value of soluble MICA levels in the serum of patients with advanced hepatocellular carcinoma. *Chin. J. Cancer*, 2013, Vol. 32, no. 3, pp. 141-148.
54. Lombana T.N., Matsumoto M.L., Iii J.B., Berkley A.M., Toy E., Cook R., Gan Y., Du C., Liu P., Sandoval W., Ye Z., Schartner J.M., Kim J., Lombana T.N., Matsumoto M.L., Iii J.B., Berkley A.M., Toy E., Cook R., Gan Y., Du C., Liu P., Schnier P., Sandoval W., Ye Z., Schartner J.M., Kim J., Spiess C. High-resolution glycosylation site-engineering method identifies MICA epitope critical for shedding inhibition activity of anti-MICA antibodies. *mAbs*, 2019, Vol. 11, no. 1, pp. 75-93.
55. Lu J., Luo L., Guo Y., Long D., Wei L., Shan J., Feng L., Li S., Yang X., Lu Y., Krams S., Li Y. The effect of MICA antigens on transplant outcomes: a systematic review. *J. Evid. Based Med.*, 2011, Vol. 4, no. 2, pp. 106-121.
56. Lu Y., Hu J., Sun W., Duan X., Chen X. Hypoxia-mediated immune evasion of pancreatic carcinoma cells. *Mol. Med. Rep.*, 2015, Vol. 11, no. 5, pp. 3666-3672.
57. Lundholm M., Schröder M., Nagaeva O., Baranov V., Widmark A., Mincheva-Nilsson L., Wikström P. Prostate tumor-derived exosomes down-regulate NKG2D expression on natural killer cells and CD8⁺ T cells: mechanism of immune evasion. *PLoS One*, 2014, Vol. 9, no. 9, e108925. doi: 10.1371/journal.pone.0108925.
58. Luo D., Dong X.W., Yan B., Liu M., Xue T.H., Liu H., You J.H., Li F., Wang Z.L., Chen Z.N. MG132 selectively upregulates MICB through the DNA damage response pathway in A549 cells. *Mol. Med. Rep.*, 2019, Vol. 19, no. 1, pp. 213-220.
59. Møllergaard M., Skovbakke S.L., Schneider C.L., Lauridsen F., Andresen L., Jensen H., Skov S. N-glycosylation of asparagine 8 regulates surface expression of major histocompatibility complex class I chain-related protein A (MICA) alleles dependent on threonine 24. *J. Biol. Chem.*, 2014, Vol. 289, no. 29, pp. 20078-20091.
60. Menier C., Riteau B., Carosella E.D., Rouas-Freiss N. MICA triggering signal for NK cell tumor lysis is counteracted by HLA-G1-mediated inhibitory signal. *Int. J. Cancer*, 2002, Vol. 100, no. 1, pp. 63-70.
61. Meyer A., Carapito R., Ott L., Radosavljevic M., Georgel P., Adams E.J., Parham P., Bontrop R.E., Blancher A., Bahram S. High diversity of MIC genes in non-human primates. *Immunogenetics*, 2014, Vol. 66, no. 9-10, pp. 581-587.
62. Mincheva-Nilsson L., Nagaeva O., Chen T., Stendahl U., Antsiferova J., Mogren I., Hernestål J., Baranov V. Placenta-derived soluble MHC class I chain-related molecules down-regulate NKG2D receptor on peripheral blood mononuclear cells during human pregnancy: a possible novel immune escape mechanism for fetal survival. *J. Immunol.*, 2006, Vol. 176, no. 6, pp. 3585-3592.
63. Nakajima N.I., Niimi A., Isono M., Oike T., Sato H., Nakano T., Shibata A. Inhibition of the HDAC/Suv39/G9a pathway restores the expression of DNA damage-dependent major histocompatibility complex class I-related chain A and B in cancer cells. *Oncol. Rep.*, 2017, Vol. 38, no. 2, pp. 693-702.
64. Okita R., Yukawa T., Nojima Y., Maeda A., Saisho S., Shimizu K., Nakata M. MHC class I chain-related molecule A and B expression is upregulated by cisplatin and associated with good prognosis in patients with non-small cell lung cancer. *Cancer Immunol. Immunother.*, 2016, Vol. 65, no. 5, pp. 499-509.
65. Onyeaghala G., Nelson H.H., Thyagarajan B., Linabery A.M., Panoskaltsis-Mortari A., Gross M., Anderson K.E., Prizment A.E. Soluble MICA is elevated in pancreatic cancer: results from a population based case-control study. *Mol. Carcinog.*, 2017, Vol. 56, no. 9, pp. 2158-2164.
66. Ostberg J.R., Dayanc B.E., Yuan M., Ofazoglu E., Repasky E.A. Enhancement of natural killer (NK) cell cytotoxicity by fever-range thermal stress is dependent on NKG2D function and is associated with plasma

membrane NKG2D clustering and increased expression of MICA on target cells. *J. Leukoc. Biol.*, 2007, Vol. 82, no. 5, pp. 1322-1331.

67. Paschen A., Sucker A., Hill B., Moll I., Zapatka M., Xuan D.N., Geok C.S., Gutmann I., Hassel J., Becker J.C., Steinle A., Schadendorf D., Ugurel S. Differential clinical significance of individual NKG2D ligands in melanoma: soluble ULBP2 as an indicator of poor prognosis superior to S100B. *Clin. Cancer Res.*, 2009, Vol. 15, no. 16, pp. 5208-5215.

68. Raulet D.H., Gasser S., Gowen B.G., Deng W., Jung H. Regulation of ligands for the NKG2D activating receptor. *Annu. Rev. Immunol.*, 2013, Vol. 31, pp. 413-441.

69. Rebmann V., Schütt P., Brandhorst D., Opalka B., Moritz T., Reza Nowroussian M., Grosse-Wilde H. Soluble MICA as an independent prognostic factor for the overall survival and progression-free survival of multiple myeloma patients. *Clin. Immunol.*, 2007, Vol. 123, no. 1, pp. 114-120.

70. Ribeiro C.H., Kramm K., Gálvez-jirón F., Pola V., Bustamante M., Contreras H.R., Sabag A., Garrido-tapia M., Hernández C.J., Zúñiga R., Collazo N., Sotelo P.H., Morales C., Mercado L., Catalán D., Aguillón J.C., Molina M.C. Clinical significance of tumor expression of major histocompatibility complex class I-related chains A and B (MICA / B) in gastric cancer patients. *Oncol. Rep.*, 2016, Vol. 35, pp. 1309-1317.

71. Ritter C., Fan K., Paulson K.G., Nghiem P., Schrama D., Jürgen C. Reversal of epigenetic silencing of MHC class I chain-related protein A and B improves immune recognition of Merkel cell carcinoma. *Sci. Rep.*, 2016, Vol. 6, 21678. doi 10.1038/srep21678.

72. Rodríguez-Rodero S., González S., Rodrigo L., Fernández-Morera J.L., Martínez-Borra J., López-Vázquez A., López-Larrea C. Transcriptional regulation of MICA and MICB: a novel polymorphism in MICB promoter alters transcriptional regulation by Sp1. *Eur. J. Immunol.*, 2007, Vol. 37, no. 7, pp. 1938-1953.

73. Salih H.R., Antropius H., Gieseke F., Lutz S.Z., Kanz L., Rammensee H.G., Steinle A. Functional expression and release of ligands for the activating immunoreceptor NKG2D in leukemia. *Blood*, 2003, Vol. 102, no. 4, pp. 1389-1396.

74. Salih H.R., Goehlsdorf D., Steinle A. Release of MICB molecules by tumor cells: mechanism and soluble MICB in sera of cancer patients. *Hum. Immunol.*, 2006, Vol. 67, no. 3, pp. 188-195.

75. Salih H.R., Holdenrieder S., Steinle A. Soluble NKG2D ligands: prevalence, release, and functional impact. *Front. Biosci.*, 2008, Vol. 13, pp. 3448-3456.

76. Salih H.R., Rammensee H.-G., Steinle A. Cutting edge: down-regulation of MICA on human tumors by proteolytic shedding. *J. Immunol.*, 2002, Vol. 169, no. 8, pp. 4098-4102.

77. Schilling D., Tetzlaff F., Konrad S., Li W., Multhoff G. A hypoxia-induced decrease of either MICA/B or Hsp70 on the membrane of tumor cells mediates immune escape from NK cells. *Cell Stress Chaperones*, 2015, Vol. 20, no. 1, pp. 139-147.

78. Schrambach S., Ardizzone M., Leymarie V., Sibilia J., Bahram S. *In vivo* expression pattern of MICA and MICB and its relevance to auto-immunity and cancer. *PLoS One*, 2007, Vol. 2, no. 6, e518. doi: 10.1371/journal.pone.0000518.

79. Sconocchia G., Spagnoli G.C., Del Principe D., Ferrone S., Anselmi M., Wongsena W., Cervelli V., Schultz-Thater E., Wyler S., Carafa V., Moch H., Terracciano L., Tornillo L. Defective infiltration of natural killer cells in MICA/B-positive renal cell carcinoma involves 2-integrin-mediated interaction. *Neoplasia*, 2009, Vol. 11, no. 7, pp. 662-671.

80. Shi P., Yin T., Zhou F., Cui P., Gou S., Wang C. Valproic acid sensitizes pancreatic cancer cells to natural killer cell-mediated lysis by upregulating MICA and MICB via the PI3K/Akt signaling pathway. *BMC Cancer*, 2014, Vol. 14, no. 1, pp. 1-10.

81. Siemens D.R., Hu N., Sheikhi A.K., Chung E., Frederiksen L.J., Pross H., Graham C.H. Hypoxia increases tumor cell shedding of MHC class I chain-related molecule: role of nitric oxide. *Cancer Res.*, 2008, Vol. 68, no. 12, pp. 4746-4754.

82. Strong R.K., McFarland B.J. NKG2D and related immunoreceptors. *Adv. Protein Chem.*, 2004, Vol. 68, pp. 281-312.

83. Suemizu H., Radosavljevic M., Kimura M., Sadahiro S., Yoshimura S., Bahram S., Inoko H. A basolateral sorting motif in the MICA cytoplasmic tail. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 2002, Vol. 99, no. 5, pp. 2971-2976.

84. Sun D., Wang X., Zhang H., Deng L., Zhang Y. MMP9 mediates MICA shedding in human osteosarcomas. *Cell Biol. Int.*, 2011, Vol. 35, no. 6, pp. 569-574.

85. Tamaki S., Kawakami M., Ishitani A., Kawashima W., Kasuda S., Yamanaka Y., Shimomura H., Imai Y., Nakagawa Y., Hatake K., Kirita T. Soluble MICB serum levels correlate with disease stage and survival rate in patients with oral squamous cell carcinoma. *Anticancer Res.*, 2010, Vol. 30, no. 10, pp. 4097-4101.

86. Tamaki S., Kawakami M., Yamanaka Y., Shimomura H., Imai Y., Ishida J. ichi, Yamamoto K., Ishitani A., Hatake K., Kirita T. Relationship between soluble MICA and the MICA A5.1 homozygous genotype in patients with oral squamous cell carcinoma. *Clin. Immunol.*, 2009, Vol. 130, no. 3, pp. 331-337.

87. Tamaki S., Sanefuzi N., Kawakami M., Aoki K., Imai Y., Yamanaka Y., Yamamoto K., Ishitani A., Hatake K., Kirita T. Association between soluble MICA levels and disease stage IV oral squamous cell carcinoma in Japanese patients. *Hum. Immunol.*, 2008, Vol. 69, no. 2, pp. 88-93.
88. Tieng V., le Bouguénec C., du Merle L., Bertheau P., Desreumaux P., Janin A., Charron D., Toubert A. Binding of Escherichia coli adhesin AfaE to CD55 triggers cell-surface expression of the MHC class I-related molecule MICA. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 2002, Vol. 99, no. 5, pp. 2977-2982.
89. Trembath A.P., Markiewicz M.A. More than decoration: Roles for natural killer group 2 member D ligand expression by immune cells. *Front. Immunol.*, 2018, Vol. 9, 231. doi: 10.3389/fimmu.2018.00231.
90. Venkataraman G.M., Suci D., Groh V., Boss J.M., Spies T. Promoter region architecture and transcriptional regulation of the genes for the MHC class I-Related chain A and B ligands of NKG2D. *J. Immunol.*, 2007, Vol. 178, no. 2, pp. 961-969.
91. Wang L.P., Niu H., Xia Y.F., Han Y.L., Niu P., Wang H.Y., Zhou Q.L. Prognostic significance of serum sMICA levels in non-small cell lung cancer. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.*, 2015, Vol. 19, no. 12, pp. 2226-2230.
92. Wang T., Sun F., Xie W., Tang M., He H., Jia X., Tian X., Wang M., Zhang J. A bispecific protein rG7S-MICA recruits natural killer cells and enhances NKG2D-mediated immunosurveillance against hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett.*, 2016, Vol. 372, no. 2, pp. 166-178.
93. Wang X., Lundgren A.D., Singh P., Goodlett D.R., Stephen R., Wu J.D. An six-amino therapeutic target to inhibit shedding. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2010, Vol. 387, pp. 476-481.
94. Watson N.F.S., Spendlove I., Madjd Z., McGilvray R., Green A.R., Ellis I.O., Scholefield J.H., Durrant L.G. Expression of the stress-related MHC class I chain-related protein MICA is an indicator of good prognosis in colorectal cancer patients. *Int. J. Cancer*, 2006, Vol. 118, no. 6, pp. 1445-1452.
95. Weiss T., Schneider H., Silginer M., Steinle A., Pruschy M., Polic B., Weller M., Roth P. NKG2D-Dependent antitumor effects of chemotherapy and radiotherapy against glioblastoma. *Clin. Cancer Res.*, 2017, Vol. 24, no. 4, pp. 882-895.
96. Weiss-Steider B., Soto-Cruz I., Martinez-Campos C.A., Mendoza-Rincon J.F. Expression of MICA, MICB and NKG2D in human leukemic myelomonocytic and cervical cancer cells. *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, 2011, Vol. 30, no. 1, pp. 1-8.
97. Wensveen F.M., Jelenc V., Polic B. NKG2D: a master regulator of immune cell responsiveness. *Front. Immunol.*, 2018, Vol. 9, 441. doi: 10.3389/fimmu.2018.00441.
98. Wills M.R., Ashiru O., Reeves M.B., Okecha G., Trowsdale J., Tomasec P., Wilkinson G.W.G., Sinclair J., Sissons J.G.P. Human cytomegalovirus encodes an MHC class I-like molecule (UL142) that functions to inhibit NK cell lysis. *J. Immunol.*, 2005, Vol. 175, no. 11, pp. 7457-7465.
99. Wu B.J., Li W.P., Qian C., Ding W., Zhou Z.W., Jiang H. Serum soluble MICB (sMICB) correlates with disease progression and survival in melanoma patients. *Tumor Biol.*, 2013, Vol. 34, no. 1, pp. 565-569.
100. Wu Y., Li J., Jabbarzadeh Kaboli P., Shen J., Wu X., Zhao Y., Ji H., Du F., Zhou Y., Wang Y., Zhang H., Yin J., Wen Q., Cho C.H., Li M., Xiao Z. Natural killer cells as a double-edged sword in cancer immunotherapy: a comprehensive review from cytokine therapy to adoptive cell immunotherapy. *Pharmacol. Res.*, 2020, Vol. 155, 104691. doi: 10.1016/j.phrs.2020.104691].
101. Wust P., Hildebrandt B., Sreenivasa G., Rau B., Gellermann J., Riess H., Felix R., Schlag P.M. Hyperthermia in combined treatment of cancer. *Lancet Oncol.*, 2002, Vol. 3, no. 8, pp. 487-497.
102. Xei W., Liu F., Wang Y., Ren X., Wang T., Chen Z., Tang M., Sun F., Li Z., Wang M., Zhang J. VEGFR2 targeted antibody fused with MICA stimulates NKG2D mediated immunosurveillance and exhibits potent anti-tumor activity against breast cancer. *Oncotarget*, 2016, Vol. 7, no. 13, pp. 16455-16471.
103. Xu X., Rao G.S., Groh V., Spies T., Gattuso P., Kaufman H.L., Plate J., Prinz R.A. Major histocompatibility complex class I-related chain A/B (MICA/B) expression in tumor tissue and serum of pancreatic cancer: role of uric acid accumulation in gemcitabine-induced MICA/B expression. *BMC Cancer*, 2011, Vol. 11, 194. doi: 10.1186/1471-2407-11-194.
104. Yamada N., Yamanegi K., Ohyama H., Hata M., Nakasho K., Futani H., Okamura H., Terada N. Hypoxia downregulates the expression of cell surface MICA without increasing soluble MICA in osteosarcoma cells in a HIF-1-dependent manner. *Int. J. Oncol.*, 2012, Vol. 41, no. 6, pp. 2005-2012.
105. Zhang C., Wang Y., Zhou Z., Zhang J., Tian Z. Sodium butyrate upregulates expression of NKG2D ligand MICA/B in HeLa and HepG2 cell lines and increases their susceptibility to NK lysis. *Cancer Immunol. Immunother.*, 2009, Vol. 58, no. 8, pp. 1275-1285.
106. Zhang X., Yan L., Jiao W., Ren J., Xing N. The clinical and biological significance of MICA in clear cell renal cell carcinoma patients. *Tumor Biol.*, 2016, Vol. 37, pp. 2153-2159.
107. Zhao S., Wang H., Nie Y., Mi Q., Chen X., Hou Y. Midkine upregulates MICA/B expression in human gastric cancer cells and decreases natural killer cell cytotoxicity. *Cancer Immunol. Immunother.*, 2012, Vol. 61, no. 10, pp. 1745-1753.
108. Zhao Y., Chen N., Yu Y., Zhou L., Niu C., Liu Y., Tian H., Lv Z., Han F., Cui J. Prognostic value of MICA / B in cancers: a systematic review. *Oncotarget*, 2017, Vol. 8, no. 56, pp. 96384-96395.

109. Zingoni A., Cecere F., Vulpis E., Fionda C., Molfetta R., Soriani A., Petrucci M.T., Ricciardi M.R., Fuerst D., Amendola M.G., Mytilineos J., Cerboni C., Paolini R., Cippitelli M., Santoni A. Genotoxic stress induces senescence-associated ADAM10-dependent release of NKG2D MIC ligands in multiple myeloma cells, *J. Immunol.*, 2015, Vol. 195, no. 2, pp. 736-748.
110. Zou Y., Bresnahan W., Taylor R.T., Stastny P. Effect of human cytomegalovirus on expression of MHC class I-Related chains A. *J. Immunol.*, 2005, Vol. 174, no. 5, pp. 3098-3104.
111. Zou Y., Mirbaha F., Lazaro A., Zhang Y., Lavingia B., Stastny P. MICA is a target for complement-dependent cytotoxicity with mouse monoclonal antibodies and human alloantibodies. *Hum. Immunol.*, Vol. 63, pp. 30-39.
112. Zwirner N.W., Dole K., Stastny P. Differential surface expression of MICA by endothelial cells, fibroblasts, keratinocytes, and monocytes. *Hum. Immunol.*, 1999, Vol. 60, no. 4, pp. 323-330.
113. Zwirner N.W., Fuertes M.B., Girart M.V., Domaica C.I., Rossi L.E. Cytokine-driven regulation of NK cell functions in tumor immunity: role of the MICA-NKG2D system. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 2007, Vol. 18, no. 1-2, pp. 159-170.

Авторы:

Столбовая А.Ю. — научный сотрудник лаборатории гибридной технологии ФГБУ «Российский научный центр радиологии и хирургических технологий имени академика А.М. Гранова» Министерства здравоохранения РФ; лаборант-исследователь ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта»; аспирант ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Смирнов И.В. — к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории гибридной технологии ФГБУ «Российский научный центр радиологии и хирургических технологий имени академика А.М. Гранова» Министерства здравоохранения РФ; младший научный сотрудник ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта», Санкт-Петербург, Россия

Самойлович М.П. — д.б.н., главный научный сотрудник лаборатории гибридной технологии ФГБУ «Российский научный центр радиологии и хирургических технологий имени академика А.М. Гранова» Министерства здравоохранения РФ; профессор кафедры цитологии и гистологии ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург, Россия

Authors:

Stolbovaya A. Yu., Research Associate, Laboratory of Hybridoma Technology, A. Granov Russian Research Center for Radiology and Surgical Technologies; Research Laboratory Assistant, D. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology; Postgraduate Student, V. Almazov National Medical Research Center, St. Petersburg, Russian Federation

Smirnov I.V., PhD (Biology), Leading Research Associate, Laboratory of Hybridoma Technology, A. Granov Russian Research Center for Radiology and Surgical Technologies; Junior Research Associate, D. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology, St. Petersburg, Russian Federation

Samoylovich M.P., PhD, MD (Biology), Main Research Associate, Head, Laboratory of Hybridoma Technology, A. Granov Russian Research Center for Radiology and Surgical Technologies, St. Petersburg, Russian Federation; Professor, Department of Cytology and Histology, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation

ВЛИЯНИЕ ТАБАЧНОГО ДЫМА И НИКОТИНА НА ИММУННЫЙ ОТВЕТ ПРИ ТУБЕРКУЛЕЗЕ И ДРУГИХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ ЛЕГКИХ

Чумоватов Н.В., Еремеев В.В., Эргешов А.Э.

ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза», Москва, Россия

Резюме. Проблема курения, как и заболеваемость туберкулезом, существует уже длительное время. Последние данные ВОЗ указывают на гибель 1,3 миллионов человек от туберкулеза и 7 миллионов от курения ежегодно. Табачный дым содержит множество вредных химических веществ, включая окись углерода, никотин, оксиды азота и кадмий. Ряд исследований свидетельствуют о высокой распространенности курения среди больных туберкулезом. В большинстве случаев заражение микобактериями туберкулеза не приводит к развитию активного заболевания вследствие развития сбалансированного, гомеостатического иммунного ответа. Ключевыми компонентами защиты служат воспалительные реакции, направленные на сдерживание роста патогена, его секвестрацию и окончательную элиминацию. В то же время избыточный или неадекватный иммунный ответ способен приводить к расплавлению гранулемы, повреждению тканей и, как следствие, увеличению сроков излечения и инвалидизации перенесших туберкулез ввиду снижения дыхательной функции легких. Наряду с провоспалительными, в организме хозяина синтезируются противовоспалительные медиаторы, которые способны положительно или отрицательно влиять на течение заболевания в зависимости от места и времени их появления. Баланс между про- и противовоспалительными медиаторами по времени и уровню экспрессии играет важнейшую роль в определении исхода инфекции. В нашем обзоре мы рассматриваем влияние табачного дыма на различные составляющие иммунной системы человека, а также на течение и исход туберкулеза и других заболеваний легких. Кроме того, мы хотели бы заострить внимание читателя на необходимости корректировки патогенетической терапии бронхолегочных заболеваний с учетом курительных привычек больного. Курение табака является одной из главных причин тяжелого течения многих инфекционных и неинфекционных заболеваний, в том числе бронхолегочной системы. Продукты распада сигаретного дыма нарушают работу мерцательного эпителия дыхательных путей, продукцию слизистого компонента в бронхах и снижают эффективность системы сурфактанта. Это негативно сказывается на работе защитных механизмов дыхательной системы человека. Стоит отметить, что табачный дым оказывает и системное воздействие на иммунную систему. Накапливаются данные об ассоциации продолжительности воздействия табачного дыма с рядом неблагоприятных клинических характеристик туберкулеза, такими как массивность инфицирования, тяжесть течения, время абацилирования, реактивация, исход лечения и смертность. В то же время эпидемиологические исследования способны выявить ассоциации, но не позволяют определить причинно-следственные связи.

Ключевые слова: табак, никотин, туберкулез, иммунный ответ, заболевания легких, микобактерии

Адрес для переписки:

Чумоватов Никита Владимирович
ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский
институт туберкулеза»
107564, Россия, Москва, Яузская аллея, 2.
Тел.: 8 (903) 624-34-82.
E-mail: Necro5412@mail.ru

Address for correspondence:

Chumovатов Nikita V.
Central Research Institute of Tuberculosis
107564, Russian Federation, Moscow, Yauzskaya lane, 2.
Phone: 7 (903) 624-34-82.
E-mail: Necro5412@mail.ru

Образец цитирования:

Н.В. Чумоватов, В.В. Еремеев, А.Э. Эргешов «Влияние
табачного дыма и никотина на иммунный ответ
при туберкулезе и других заболеваниях легких» // *Медицинская иммунология*, 2022.
Т. 24, № 3. С. 455-462.
doi: 10.15789/1563-0625-EOT-2484
© Чумоватов Н.В. и соавт., 2022

For citation:

N.V. Chumovатов, V.V. Ereemeev, A.E. Ergeshov "Effect of
tobacco smoke and nicotine on immune response in tuberculosis
infection and other lung diseases", *Medical Immunology
(Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2022, Vol. 24, no. 3,
pp. 455-462.
doi: 10.15789/1563-0625-EOT-2484
DOI: 10.15789/1563-0625-EOT-2484

EFFECT OF TOBACCO SMOKE AND NICOTINE ON IMMUNE RESPONSE IN TUBERCULOSIS INFECTION AND OTHER LUNG DISEASES

Chumovатов N.V., Ereemeev V.V., Ergeshov A.E.

Central Research Institute of Tuberculosis, Moscow, Russian Federation

Abstract. The problem of smoking, as well as incidence of tuberculosis, has existed for a long time. The latest WHO data indicate that 1.3 million people die from tuberculosis, and another 7 millions die from smoking every year. Tobacco smoke contains many harmful chemicals, including carbon monoxide, nicotine, nitrogen oxides, and cadmium. A number of studies indicate a high prevalence of smoking among patients with tuberculosis. In most cases, infection with *Mycobacterium tuberculosis* does not lead to active disease, due to the development of a balanced, homeostatic immune response. The key protective components are inflammatory responses aimed at inhibition of the pathogen growth, its sequestration and final elimination. At the same time, excessive or inadequate immune response may lead to granuloma destruction, tissue damage and, as a result, prolonged duration of treatment due to decreased respiratory function of the lungs. Along with pro-inflammatory mediators, anti-inflammatory mediators are synthesized in the host organism, which can positively or negatively affect the course of disease, depending on the place and time of their production. The balance between pro- and anti-inflammatory mediators in terms of time and expression level plays a crucial role in determining the outcome of infection. In our review, we consider the impact of tobacco smoke on various components of the human immune system, as well as upon the course and outcome of tuberculosis and other lung diseases. In addition, we would like to draw the reader's attention to the need of adjusting pathogenetic therapy of bronchopulmonary diseases, taking into account the patient's smoking habits. Tobacco smoking is one of the main causes of the severe course of many infectious and non-infectious diseases of the bronchopulmonary system. The decay products of cigarette smoke disrupt the functioning of the ciliated epithelium of respiratory tract, the production of the mucous component in the bronchi, and reduce the effectiveness of the surfactant system. These negative events interfere with protective mechanisms of the human respiratory system. It is worth of note that tobacco smoke also exerts a systemic effect on the immune system. Data are accumulating on the association between the terms of exposure to tobacco smoke, and a range of adverse tuberculosis manifestations, such as extent of infection, severity of course, reactivation, treatment outcome, and mortality. At the same time, epidemiological studies are able to reveal the associations, but they do not allow us to determine exact causal relationships.

Keywords: tobacco, nicotine, tuberculosis, immune response, lung diseases, mycobacteria

У большинства людей заражение микобактериями туберкулеза (МБТ) не приводит к развитию активного заболевания вследствие развития сбалансированного, гомеостатического иммунного ответа. Ключевыми компонентами защиты служат воспалительные реакции, направленные на сдерживание роста патогена, его секвестрацию и окончательную элиминацию. В то же время избыточный или неадекватный иммунный ответ способен приводить к расплавлению гранулемы, повреждению тканей и, как следствие, увеличению сроков излечения и инвалидизации перенесших туберкулез (ТБ) ввиду снижения дыхательной функции легких. Наряду с провоспалительными, в организме хозяина синтезируются противовоспалительные медиаторы, которые способны положительно или отрицательно влиять на течение заболевания в зависимости от места и времени их появления. Баланс между про- и противовоспалительными медиаторами по времени

и уровню экспрессии играет важнейшую роль в определении исхода инфекции. Интересно отметить, что *M. tuberculosis* способна манипулировать обеими ветвями иммунного ответа, подстраивая микроокружение в организме хозяина к собственной выгоде. В нашем обзоре мы рассматриваем влияние табачного дыма (ТД) на различные составляющие иммунной системы человека, а также на течение и исход ТБ и других заболеваний легких. Кроме того, мы хотели бы заострить внимание на необходимости корректировки патогенетической терапии бронхолегочных заболеваний с учетом курительных привычек больного.

Курение табака является одной из главных причин тяжелого течения многих инфекционных и неинфекционных заболеваний, в том числе бронхолегочной системы. Продукты распада сигаретного дыма нарушают работу мерцательного эпителия дыхательных путей, продукцию слизистого компонента в бронхах и снижают эффек-

тивность системы сурфактанта. Это негативно сказывается на работе защитных механизмов дыхательной системы человека. Стоит отметить, что табачный дым оказывает и системное воздействие на иммунную систему. Накапливаются данные об ассоциации продолжительности воздействия ТД с рядом неблагоприятных клинических характеристик ТБ, такими как массивность инфицирования, тяжесть течения, время абацилирования, реактивация, исход лечения и смертность [65]. В то же время эпидемиологические исследования способны выявить ассоциации, но не позволяют определить причинно-следственные связи. С этой целью проведен целый ряд клинических и экспериментальных исследований *in vivo* и *in vitro*, направленных на изучение влияния ТД на иммунный статус человека и животных.

Взаимосвязь курения табака и развития туберкулезной инфекции

Проблема курения, как и заболеваемость ТБ, существует уже длительное время. Последние данные ВОЗ указывают на гибель 1,3 миллионов человек от ТБ и 7 миллионов от курения ежегодно [68, 69]. Курение сигарет широко распространено во всем мире. Установлено, что примерно треть взрослого населения курит табак [20]. ТД содержит множество вредных химических веществ, включая окись углерода, никотин, оксиды азота и кадмий [47]. Примечательно, что в странах с высоким уровнем заболеваемости ТБ, как правило, также наблюдается повышенная доля курильщиков [3]. Ряд исследований свидетельствуют о высокой распространенности курения среди больных туберкулезом [10, 19, 51]. Причиной высокой смертности является неуклонный рост заболеваемости ТБ с множественной и широкой лекарственной устойчивостью (МЛУ/ШЛУ) микобактерий ТБ (МБТ) и низкая эффективность лечения этой категории пациентов. При множественной лекарственной устойчивости возбудителя эффективность лечения в мире составляет 48%, при широкой лекарственной устойчивости – 34% [21], а в Российской Федерации клиническое излечение туберкулеза с МЛУ МБТ регистрируется у 37,7% больных. Имеются данные о том, что ТД является фактором риска развития туберкулеза, способствующим прогрессированию активного специфического процесса и усугубляющим тяжесть заболевания [6, 53]. Кроме того, ряд исследований свидетельствует о неблагоприятных результатах лечения туберкулезной инфекции и формировании лекарственной устойчивости МБТ в связи с курением сигарет [33, 67]. Метаанализ данных о взаимосвязи курения и эффективности лечения туберкулезной инфекции показал, что среди 47770 больных ТБ курильщиками являлись 33%. При этом

среди пациентов с неудовлетворительными результатами лечения ТБ оказалось на 50% курильщиков больше, чем среди пациентов с успешным лечением ТБ [11]. Помимо этого, пассивное курение также является фактором риска заражения МБТ и развития туберкулезного процесса [22].

Влияние ТД и его компонентов на экспрессию маркеров воспаления

Никотин, очевидно, является наиболее известным и изученным компонентом ТД. Поскольку никотин оказывает супрессорное воздействие на иммунную систему, резонно предположить, что никотин способствует развитию ТБ. Так, рядом авторов показано, что никотин подавляет продукцию IL-12, TNF и IFN γ [42], функцию и пролиферацию эффекторных Т-клеток [57], продукцию антимикробного пептида кателицидина [46], активацию TH1 дендритными клетками [46], формирование гранул [35] и апоптоз [72]. С другой стороны, никотин активирует иммуносупрессивные холинэргические каскады [56] и усиливает иммуносупрессорную активность регуляторных Т-клеток [64].

Курение влияет на выработку многих иммунных или воспалительных медиаторов, включая как провоспалительные, так и противовоспалительные цитокины [12, 18, 24, 36]. Известно, что курение влияет и на врожденный, и на адаптивный иммунитет человека [45]. У курильщиков нарушен местный иммунитет в легких, и в целом они более восприимчивы к легочным инфекциям [28]. Вдыхание ТД приводит к снижению фагоцитарной активности макрофагов, а также их способности сдерживать внутриклеточный рост микобактерий, ослаблению продукции цитокинов и хемокинов, а также сдвигу клеточной гибели макрофагов от апоптоза к некрозу [2, 29, 40, 52]. Установлено также, что курение табака влияет на экспрессию регуляторных микроРНК. Так, например, Graff J. и соавт. [23] обнаружили снижение экспрессии miR-452 в макрофагах курильщиков. В свою очередь, miR-452 подавляет транскрипцию MMP12 – важного медиатора связанных с курением заболеваний. В то же время имеются данные, что негативное влияние курения сигарет на иммунную систему ослабевает в течение шести недель после прекращения курения [1, 26].

Воспалительная реакция является главным защитным механизмом при проникновении различных инфекционных агентов и токсических веществ. Продукты, содержащиеся в ТД, поступают в бронхолегочную систему человека, что приводит к длительной выработке ряда факторов воспаления. Forsslund H. и соавт. проанализировали фенотипы Т-клеток в бронхоальвеолярном лаваже (БАЛ) и периферической крови 40 неку-

рящих, 40 курильщиков с нормальной функцией легких и 38 пациентов с хронической обструктивной болезнью легких (ХОБЛ) [17]. Было установлено, что процент CD8⁺T-клеток в БАЛ курящих пациентов выше, чем у некурящих. При этом процентное содержание CD4⁺T-клеток как в БАЛ, так и в крови курильщиков было ниже, чем у некурящих [17]. Исследование Zhang M.Q. и соавт. указывает, что циркуляция Т-хелперов нарушена у пациентов с ХОБЛ по сравнению с некурящими [73]. В исследовании Vargas-Rojas M.I. и соавт. продемонстрировано, что процент Th17 в циркулирующих Т-клеточных подмножествах у пациентов с ХОБЛ был выше, чем у нынешних курильщиков без ХОБЛ и у здоровых людей, в то время как процент Th1 также был увеличен у пациентов с ХОБЛ и нынешних курильщиков без ХОБЛ [63]. В Китае было проведено исследование на мышах, подвергнутых хроническому воздействию табачного дыма. У них наблюдалось увеличение подмножества Th17, сопровождающееся повышением содержания цитокинов IL-6, IL-17A и IL-23 в легочной ткани и периферической крови [66]. В другом исследовании изучали клетки БАЛ от мышей, которые подвергались воздействию табачного дыма в течение не менее шести месяцев. Анализ показал, что обработка табачным дымом ведет к повышению содержания клеток Th1 и Th17 в БАЛ мышей [25].

Альвеолярные макрофаги

Изучение альвеолярных макрофагов на фоне курения табака привлекает внимание ученых во всем мире. Многие исследования указывают, что курильщики имеют больше альвеолярных макрофагов, чем некурящие, но эти макрофаги обладают пониженной функциональностью [41]. Se nadh M. и соавт. проводили сравнение альвеолярных макрофагов курильщиков и некурящих. Количество АМ у курильщиков было значительно больше (fold change < 13) ($> 40 \times 10^4$ кл/мл) и наблюдалась тенденция к увеличению спонтанной гибели клеток макрофагов у курильщиков и бывших курильщиков по сравнению с некурящими ($> 20\%$). Также наблюдали тенденцию к увеличению внутриклеточной выживаемости МБТ (H37Ra) в АМ курильщиков по сравнению с некурящими [40].

Альвеолярные макрофаги курильщиков, инфицированные микобактериями туберкулеза, имеют нарушенные цитокиновые реакции по сравнению с некурящими. После инфицирования МБТ АМ у некурящих выделяли достоверно больше TNF (> 1000 пг/мл) и IL-1 β (> 10 пг/мл) по сравнению с неинфицированными макрофагами ($p < 0,05$). Макрофаги от курильщиков и бывших курильщиков, однако, не смогли выделить значительно больше TNF, IFN γ или IL-1 β в

ответ на МБТ-инфекцию по сравнению с неинфицированными клетками [40]. Исходя из этого, можно сделать вывод, что альвеолярные макрофаги играют важную роль в длительном воспалительном ответе при контакте с табачным дымом и их изучение является весьма актуальным.

Фактор некроза опухоли

TNF играет значимую роль в иммунном ответе на МБТ-инфекцию [15, 16]. TNF является важным цитокином, участвующим в воспалительных процессах, выживании клеток, росте и дифференцировке, а также в апоптозе [50]. TNF участвует в управлении воспалительными заболеваниями дыхательных путей, и существует связь между ХОБЛ и TNF [54]. Существуют исследования, указывающие на повышенную продукцию TNF α при поступлении компонентов табачного дыма в организм. В одном исследовании было обнаружено, что концентрация TNF значительно повышена у пациентов с ХОБЛ (6,97 пг/мл) по сравнению с контролем (5,3 ПГ/мл) [71]. В другом исследовании сообщается, что курильщики, выкуривавшие более одной пачки сигарет в день, имели более высокий уровень сывороточного TNF, чем те, кто курил менее одной пачки сигарет в день [43].

Нейтрофилы в мокроте

С точки зрения определения воспалительных биомаркеров мокрота почти так же пригодна, как БАЛ или биопсия легкого, а ее сбор относительно безопасен и не требует больших усилий [70]. Имеется несколько исследований, которые показывают, что количество нейтрофилов в мокроте связано с респираторными заболеваниями, такими как ХОБЛ, бронхиальная астма и хронический фиброз [9, 59, 70]. Однако было обнаружено, что уровень нейтрофилов в мокроте остается повышенным или даже увеличивается после прекращения курения и остается таковым даже через несколько месяцев или лет. Предполагается, что связанное с курением воспаление дыхательных путей сохраняется в течение значительного периода времени [33].

CD8

Маено Т. и соавт. показали, что IP-10 из CD8⁺ способствуют выработке макрофагальной эластазы, способствуя фрагментации эластина и повреждению легких [34]. Исследование Nadigel J. и соавт. продемонстрировало, что CD8⁺T-клетки служат ключевым медиатором возникновения ХОБЛ. Установлено, что CD8⁺T-клетки либо из легочной ткани больных ХОБЛ, либо подвергшиеся воздействию сигаретного дыма экспрессировали больше белков TLR4 и TLR9 по сравнению с группой контроля [38]. В исследовании, связанном с возникновением эмфиземы у мышей, показано, что сигаретный дым не только

увеличивает процент IL-21⁺Th17-лимфоцитов IL-21P⁺CD8⁺T-клетки в крови, но также усиливает экспрессию IL-17 и IL-21, которые в свою очередь повышали уровень перфорина и гранзима в CD8⁺T-клетки, указывающие на цитотоксическую функцию CD8⁺T-клетки, которые могут регулироваться Th17-клетками при эмфиземе [14].

Регуляторные Т-лимфоциты

Эпидемиологические исследования показали, что воздействие дыма связано с дисбалансом Т-регуляторных клеток (TREGS) у пациентов с ХОБЛ или курильщиков. Barcelo B. и др. сообщали о значительном снижении регуляции CD4⁺CD25⁺T-регуляторных клеток в БАЛ больных ХОБЛ по сравнению со здоровыми курильщиками [4]. В ряде других исследований анализ БАЛ у курильщиков и больных ХОБЛ показал, что процент CD4⁺CD25⁺Tregs был увеличен по сравнению со здоровыми некурящими людьми [48, 49, 55]. Более того, распространенность CD4⁺FoxP3⁺Treg-клеток также была выше в легочной ткани и периферической крови у пациентов с ХОБЛ по сравнению с некурящими [44, 63]. Исследование Hou J., Sun Y.C. и соавт. показало, что у пациентов с ХОБЛ был более низкий процент супрессивных TREGS, но более высокий процент клеток FrIII по сравнению со здоровыми курильщиками, хотя частоты трех подмножеств TREGS были все увеличены у курильщиков по сравнению с некурящими, что говорит о том, что дисбаланс регуляторных Т-лимфоцитов оказывает влияние на патогенез ХОБЛ [30].

Клетки памяти

Лимфоциты памяти играют важную роль в иммунной защите человека. Предыдущие исследования показали, что курение табака, повышает количество Т-клеток памяти (CD3⁺CD45RO⁺, CD4⁺CD45RO⁺) и В-клеток памяти [7, 13, 39]. Brandsma C.A. и соавт. указывают, что активное курение у пациентов с ХОБЛ также индуцировало высокий уровень В-клеток памяти IgG⁺ в легких [8]. Однако Vardavas C.I. и др. отметили противоположное влияние курения табака на Т-клетки памяти человека. Была обнаружена значимая корреляция пассивного курения со сниженными частотами CD3⁺CD45RO⁺ и CD4⁺CD45RO⁺T-клеток памяти в крови детей, сопровождающиеся повышенным процентом CD3⁺ и CD4⁺CD45RA⁺T-клеток [62]. Qiu F. и

соавт. сделали предположение, что противоречивая роль сигаретного дыма в циркулирующих Т-клетках памяти взрослых и детей, возможно, обусловлена незрелой иммунной системой у детей, которая отличается от взрослых [45].

Окислительный стресс

Окислительный стресс и вызываемые им эффекты, такие как перекисное окисление липидов, участвуют в ряде заболеваний, связанных с курением, включая атеросклероз, рак, инфекционные болезни и ХОБЛ [5]. Кроме того, хроническое воспаление, связанное с этими заболеваниями, также вызывает окислительный стресс [58]. Доклад хирургического общества США за 2014 год указывает на окислительный стресс среди других ключевых механизмов, лежащих в основе всех основных заболеваний, связанных с курением [60]. В течение многих лет 8-iso-PGF2a считался золотым стандартом для выявления окислительного стресса [37]. Недавний метаанализ более чем 200 публикаций показал, что курение табака вызывает небольшое увеличение свободного 8-изо-PGF2a, который считается высоким уровнем окислительного повреждения [61]. Существует мнение, что ISO-PGF2a, как маркер окислительного стресса, является ценным показателем в установлении диагноза и оценки прогрессирования заболевания из-за окислительного стресса [31].

Заключение

Таким образом, можно сделать вывод, что со временем у пациентов с длительным стажем курения наблюдается стойкое повышение уровня маркеров воспалительного процесса, которые поддерживаются постоянным поступлением вредных веществ вместе с табачным дымом. При этом иммунный ответ на проникновение инфекционных агентов, в том числе туберкулезной инфекции, ослабевает. Экспертное мнение единодушно поддерживает тот факт, что отказ от курения является лучшим способом снижения риска заболеваний, связанных с сигаретным дымом, включая ХОБЛ, сердечно-сосудистые заболевания и рак легких. Курильщики, бросившие курить в возрасте 25-34 лет, не отличаются по продолжительности жизни от тех, кто никогда не курил [27].

Список литературы / References

1. Arcavi L., Benowitz N.L. Cigarette smoking and infection. *Arch. Intern. Med.*, 2004, Vol. 164, no. 20, pp. 2206-2216.
2. Aryanpur M., Mortaz E., Masjedi M.R., Tabarsi P., Garssen J., Adcock I.M., Mozafarian A., Sharifi H. Reduced phagocytic capacity of blood monocyte/macrophages in tuberculosis patients is further reduced by smoking. *Iran J. Allergy Asthma Immunol.*, 2016, Vol. 15, no. 3, pp. 174-182.

3. Bai X., Stitzel J.A., Bai A., Zambrano C.A., Phillips M., Marrack P., Chan E.D. Nicotine impairs macrophage control of *Mycobacterium tuberculosis*. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 2017, Vol. 57, no. 3, pp. 324-333.
4. Barceló B., Pons J., Ferrer J.M., Sauleda J., Fuster A., Agusti A.G. Phenotypic characterisation of T-lymphocytes in COPD: abnormal CD4⁺CD25⁺ regulatory T-lymphocyte response to tobacco smoking. *Eur. Respir. J.*, 2008, Vol. 31, no. 3, pp. 555-562.
5. Barrera G. Oxidative stress and lipid peroxidation products in cancer progression and therapy. *ISRN Oncol.*, 2012, Vol. 2012, 137289. doi: 10.5402/2012/137289.
6. Bates M.N., Khalakdina A., Pai M., Chang L., Lessa F., Smith K.R. Risk of tuberculosis from exposure to tobacco smoke: a systematic review and meta-analysis. *Arch. Intern. Med.*, 2007, Vol. 167, no. 4, pp. 335-342.
7. Brandsma C.A., Hylkema M.N., Geerlings M., van Geffen W.H., Postma D.S., Timens W., Kerstjens H.A. Increased levels of (class switched) memory B cells in peripheral blood of current smokers. *Respir. Res.* 2009, Vol. 10, no. 1, 108. doi: 10.1186/1465-9921-10-108.
8. Brandsma C.A., Kerstjens H.A.M., van Geffen W.H., Geerlings M., Postma D.S., Hylkema M.N., Timens W. Differential switching to IgG and IgA in active smoking COPD patients and healthy controls. *Eur. Respir. J.*, 2012, Vol. 40, no. 2, pp. 313-321.
9. Brindicci C., Ito K., Resta O., Pride N.B., Barnes P.J., Kharitonov S.A. Exhaled nitric oxide from lung periphery is increased in COPD. *Eur. Respir. J.*, 2005, Vol. 26, no. 1, pp. 52-59.
10. Brunet L., Pai M., Davids V., Ling D., Paradis G., Lenders L., Meldau R., van Zyl Smit R., Calligaro G., Allwood B., Dawson R., Dheda K. High prevalence of smoking among patients with suspected tuberculosis in South Africa. *Eur. Respir. J.*, 2011, Vol. 38, no. 1, pp. 139-146.
11. Burusie A., Enquesilassie F., Addissie A., Dessalegn B., Lamaro T. Effect of smoking on tuberculosis treatment outcomes: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One*, 2020, Vol. 15, no. 9, e0239333. doi: 10.1371/journal.pone.0239333.
12. César-Neto J.B., Duarte P.M., de Oliveira M.C., Casati M.Z., Tambeli C.H., Parada C.A., Sallum E.A., Nociti F.H. Jr. Smoking modulates interferon-gamma expression in the gingival tissue of patients with chronic periodontitis. *Eur. J. Oral Sci.*, 2006, Vol. 114, no. 5, pp. 403-408.
13. Chavance M., Perrot J.Y., Annesi I. Smoking, CD45RO⁺(memory), and CD45RA⁺ (naive) CD4⁺ T cells. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 1993, Vol. 148, no. 1, pp. 237-240.
14. Duan M.C., Huang Y., Zhong X.N., Tang H.J. Th17 cell enhances CD8 T-cell cytotoxicity via IL-21 production in emphysema mice. *Mediators Inflamm.*, 2012, Vol. 2012, 898053. doi: 10.1155/2012/898053.
15. Flesch I.E., Kaufmann S.H. Role of cytokines in tuberculosis. *Immunobiology*, 1993, Vol. 189, no. 3-4, pp. 316-339.
16. Flynn J.L., Goldstein M.M., Chan J., Triebold K.J., Pfeffer K., Lowenstein C.J., Schreiber R., Mak T.W., Bloom B.R. Tumor necrosis factor-alpha is required in the protective immune response against *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Immunity*, 1995, Vol. 2, pp. 561-572.
17. Forsslund H., Mikko M., Karimi R., Grunewald J., Wheelock A.M., Wahlstrom J., Skold C.M. Distribution of T-cell subsets in BAL fluid of patients with mild to moderate COPD depends on current smoking status and not airway obstruction. *Chest*, 2014, Vol. 145, no. 4, pp. 711-722.
18. Friedrichs B., Neumann U., Schuller J., Peck M.J. Cigarettesmoke-induced priming of neutrophils from smokers and non-smokers for increased oxidative burst response is mediated by TNF-alpha. *Toxicol. In Vitro*, 2014, Vol. 28, no. 7, pp. 1249-1258.
19. Gegia M., Magee M.J., Kempker R.R., Kalandadze I., Chakhaia T., Golub J.E., Blumberg H.M. Tobacco smoking and tuberculosis treatment outcomes: a prospective cohort study in Georgia. *Bull. World Health Organ.*, 2015, Vol. 93, no. 6, pp. 390-399.
20. Gilman S.L., Xun Z. Smoke: A global history of smoking. London: Reaktion Books, 2004.
21. Global tuberculosis report, 2019. Available at: <https://www.who.int/publications/i/item/9789241565714>.
22. Gonçalves R.B., Coletta R.D., Silverio K.G., Benevides L., Casati M.Z., da Silva J.S., Nociti F.H. Jr. Impact of smoking on inflammation: overview of molecular mechanisms. *Inflamm. Res.*, 2011, Vol. 60, no. 5, pp. 409-424.
23. Graff J.W., Powers L.S., Dickson A.M., Kim J., Reissetter A.C., Hassan I.H., Kremens K., Gross T.J., Wilson M.E., Monick M.M. Cigarette smoking decreases global MicroRNA expression in human alveolar macrophages. *PLoS One*, 2012, Vol. 7, no. 8, e44066. doi: 10.1371/journal.pone.0044066.
24. Hagiwara E., Takahashi K.I., Okubo T., Ohno S., Ueda A., Aoki A., Odagiri S., Ishigatsubo Y. Cigarette smoking depletes cells spontaneously secreting Th(1) cytokines in the human airway. *Cytokine*, 2001, Vol. 14, no. 2, pp. 121-126.
25. Harrison O.J., Foley J., Bolognese B.J., Long E. 3rd, Podolin P.L., Walsh P.T. Airway infiltration of CD4⁺CCR6⁺ Th17 type cells associated with chronic cigarette smoke induced airspace enlargement. *Immunol. Lett.*, 2008, Vol. 121, no. 1, pp. 13-21.
26. Hersey P., Prendergast D., Edwards A. Effects of cigarette smoking on the immune system. Follow-up studies in normal subjects after cessation of smoking. *Med. J. Aust.*, 1983, Vol. 2, no. 9, pp. 425-429.
27. Ho E., Galougahi K.K., Liu C.C., Bhindi R., Figtree G.A. Biological markers of oxidative stress: applications to cardiovascular research and practice. *Redox Biol.*, 2013, Vol. 1, no. 1, pp. 483-491.
28. Hocking W.G., Golde D.W. The pulmonary-alveolar macrophage (first of two parts). *N. Engl. J. Med.*, 1979, Vol. 301, no. 11, pp. 580-587.

29. Hodge S., Hodge G., Ahern J., Jersmann H., Holmes M., Reynolds P.N. Smoking alters alveolar macrophage recognition and phagocytic ability: implications in chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 2007, Vol. 37, no. 6, pp. 748-755.
30. Hou J., Sun Y.C., Hao Y., Zhuo J., Liu X.F., Bai P., Han J.Y., Zheng X.W., Zeng H. Imbalance between subpopulations of regulatory T cells in COPD. *Thorax*, 2013, Vol. 68, no. 12, pp. 1131-1139.
31. Janssen L.J. Isoprostanes: an overview and putative roles in pulmonary pathophysiology. *American journal of physiology. Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, 2001, Vol. 280, no. 6, pp. 1067-1082.
32. Keatings V.M., Collins P.D., Scott D.M., Barnes P.J. Differences in interleukin-8 and tumor necrosis factor-alpha in induced sputum from patients with chronic obstructive pulmonary disease or asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 1996, Vol. 153, no. 2, pp. 530-534.
33. Lin H.H., Ezzati M., Murray M. Tobacco smoke, indoor air pollution and tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. *PLoS Med.*, 2007, Vol. 4, no. 1, e20. doi: 10.1371/journal.pmed.0040020.
34. Maeno T., Houghton A.M., Quintero P.A., Grumelli S., Owen C.A., Shapiro S.D. CD8(+) T cells are required for inflammation and destruction in cigarette smoke-induced emphysema in mice. *J. Immunol.*, 2007, Vol. 178, no. 12, pp. 8090-8096.
35. Maier L.A. Is smoking beneficial for granulomatous lung diseases? (editorial). *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2004, Vol. 169, no. 8, pp. 893-895.
36. Meuronen A., Majuri M.L., Alenius H., Mantyla T., Wolff H., Piirila P., Laitinen A. Decreased cytokine and chemokine mRNA expression in bronchoalveolar lavage in asymptomatic smoking subjects. *Respiration*, 2008, Vol. 75, pp. 450-458.
37. Morrow J.D. Quantification of isoprostanes as indices of oxidant stress and the risk of atherosclerosis in humans. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2005, Vol. 25, no. 2, pp. 279-286.
38. Nadigel J., Prefontaine D., Bagloli C.J., Maltais F., Bourbeau J., Eidelman D.H., Hamid Q. Cigarette smoke increases TLR4 and TLR9 expression and induces cytokine production from CD8(+) T cells in chronic obstructive pulmonary disease. *Respir. Res.*, 2011, Vol. 12, no. 1, 149. doi: 10.1186/1465-9921-12-149.
39. Nakata A., Takahashi M., Irie M., Fujioka Y., Haratani T., Araki S. Relationship between cumulative effects of smoking. Oncotarget and memory CD4⁺ T lymphocyte subpopulations. *Addict. Behav.*, 2007, Vol. 32, no. 7, pp. 1526-1531.
40. O'Leary S.M., Coleman M.M., Chew W.M., Morrow C., McLaughlin A.M., Gleeson L.E., O'Sullivan M.P., Keane J. Cigarette smoking impairs human pulmonary immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2014, Vol. 190, no. 12, pp. 1430-1436.
41. Ohta T., Yamashita N., Maruyama M., Sugiyama E., Kobayashi M. Cigarette smoking decreases interleukin-8 secretion by human alveolar macrophages. *Respir. Med.*, 1998, Vol. 92, no. 7, pp. 922-927.
42. Ouyang Y., Virasch N., Hao P., Aubrey M.T., Mukerjee N., Bierer B.E., Freed B.M. Suppression of human IL-1beta, IL-2, IFN-gamma, and TNF-alpha production by cigarette smoke extracts. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2000, Vol. 106, no. 2, 280-287.
43. Petrescu F., Voican S.C., Silosi I. Tumor necrosis factor-alpha serum levels in healthy smokers and nonsmokers. *Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis.*, 2010, Vol. 5, pp. 217-222.
44. Plumb J., Smyth L.J.C., Adams H.R., Vestbo J., Bentley A., Singh S.D. Increased T-regulatory cells within lymphocyte follicles in moderate COPD. *Eur. Respir. J.*, 2009, Vol. 34, no. 1, pp. 89-94.
45. Qiu F., Liang C.L., Liu H., Zeng Y.Q., Hou S., Huang S., Lai X., Dai Z. Impacts of cigarette smoking on immune responsiveness: Up and down or upside down? *Oncotarget*, 2017, Vol. 8, no. 1, pp. 268-284.
46. Radek K.A., Elias P.M., Taupenot L., Mahata S.K., O'Connor D.T., Gallo R.L. Neuroendocrine nicotinic receptor activation increases susceptibility to bacterial infections by suppressing antimicrobial peptide production. *Cell Host Microbe* 2010, Vol. 7, no. 4, pp. 277-289.
47. Rennard S.I. Cigarette smoke in research. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 2004, Vol. 31, no. 5, pp. 479-480.
48. Roos-Engstrand E., Ekstrand-Hammarstrom B., Pourazar J., Behndig A.F., Bucht A., Blomberg A. Influence of smoking cessation on airway T lymphocyte subsets in COPD. *COPD*, 2009, Vol. 6, no. 2, pp. 112-120.
49. Roos-Engstrand E., Pourazar J., Behndig A.F., Bucht A., Blomberg A. Expansion of CD4(+) CD25(+) helper T cells without regulatory function in smoking and COPD. *Respir. Res.*, 2011, Vol. 12, no. 1, 74. doi: 10.1186/1465-9921-12-74.
50. Rosenberg S.R., Kalhan, R. Biomarkers in chronic obstructive pulmonary disease. *Transl. Res.*, 2012, Vol. 159, no. 4, pp. 228-237.
51. Safa M., Tabarsi P., Sharifi H. Pattern of tobacco consumption among TB patients in a Tuberculosis Referral Center. *Tanaffos*, 2011, Vol. 10, no. 2, pp. 50-55.
52. Shang S., Ordway D., Henao-Tamayo M., Bai X., Oberley-Deegan R., Shanley C. Cigarette smoke increases susceptibility to tuberculosis – evidence from *in vivo* and *in vitro* models. *J. Infect. Dis.*, 2011, Vol. 203, no. 9, pp. 1240-1248.
53. Sitas F., Urban M., Bradshaw D., Kielkowski D., Bah S., Peto R. Tobacco attributable deaths in South Africa. *Tob. Control.*, 2004, Vol. 13, no. 4, pp. 396-399.
54. Skoog T., Dichtl W., Boquist S., Skoglund-Andersson C., Karpe F., Tang R., Bond M.G., de Faire U., Nilsson J., Eriksson P., Hamsten A. Plasma tumour necrosis factor-alpha and early carotid atherosclerosis in healthy middle-aged men. *Eur. Heart J.*, 2002, Vol. 23, no. 5, pp. 376-383.

55. Smyth L.J., Starkey C., Vestbo J., Singh D. CD4-regulatory cells in COPD patients. *Chest*, 2007, 132, no. 1, pp. 156-163.
56. Sopori M.L., Kozak W., Savage S.M., Geng Y., Soszynski D., Kluger M.J., Perryman E.K., Snow G.E. Effect of nicotine on the immune system: possible regulation of immune responses by central and peripheral mechanisms. *Psychoneuroendocrinology*, 1998, Vol. 23, no. 2, pp. 189-204.
57. Sopori M.L., Kozak W. Immunomodulatory effects of cigarette smoke. *J. Neuroimmunol.*, 1998, Vol. 83, no. 1-2, pp. 148-156.
58. Thanan R., Oikawa S., Hiraku Y., Ohnishi S., Ma N., Pinlaor S., Yongvanit P., Kawanishi S., Murata M. Oxidative stress and its significant roles in neurodegenerative diseases and cancer. *Int. J. Mol. Sci.*, 2014, Vol. 16, no. 1, pp. 193-217.
59. Tsoumakidou M., Tzanakis N., Siafakas N.M. Induced sputum in the investigation of airway inflammation of COPD. *Respir. Med.*, 2003, Vol. 97, no. 8, pp. 863-871.
60. US Department of Health and Human Services. 2014. The health consequences of smoking-50 years of progress: a report of the surgeon general. Atlanta (GA): US Department of Health and Human Services.
61. van't Erve T.J., Kadiiska M.B., London S.J., Mason R.P. Classifying oxidative stress by F2-isoprostane levels across human diseases: a meta-analysis. *Redox Biol.*, 2017, Vol. 12, pp. 582-599.
62. Vardavas C.I., Plada M., Tzatzarakis M., Marcos A., Warnberg J., Gomez-Martinez S., Breidenassel C., Gonzalez-Gross M., Tsatsakis A.M., Saris W.H., Moreno L.A., Kafatos A.G., Group H.H.S. Passive smoking alters circulating naive/memory lymphocyte T-cell subpopulations in children. *Pediatr. Allergy Immunol.*, 2010, Vol. 21, no. 8, pp. 1171-1178.
63. Vargas-Rojas M.I., Ramirez-Venegas A., Limon-Camacho L., Ochoa L., Hernandez-Zenteno R., Sansores R.H. Increase of Th17 cells in peripheral blood of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Respir. Med.*, 2011, Vol. 105, no. 11, pp. 1648-1654.
64. Wang D.W., Zhou R.B., Yao Y.M., Zhu X.M., Yin Y.M., Zhao G.J., Dong N., Sheng Z.Y. Stimulation of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor by nicotine increases suppressive capacity of naturally occurring CD4+CD25+ regulatory T cells in mice *in vitro*. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 2010, Vol. 335, no. 3, pp. 553-561.
65. Wang E.Y., Arrazola R.A., Mathema B., Ahluwalia I.B., Mase S.R. The impact of smoking on tuberculosis treatment outcomes: a meta-analysis. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.*, 2020, Vol. 24, no. 2, pp. 170-175.
66. Wang H., Peng W., Weng Y., Ying H., Li H., Xia D., Yu W. Imbalance of Th17/Treg cells in mice with chronic cigarette smoke exposure. *Int. Immunopharmacol.*, 2012, Vol. 14, no. 4, pp. 504-512.
67. Wang M.-G., Huang W.-W., Wang Y., Zhang Y.-X., Zhang M.-M., Wu S.-Q., Sandford A.J., He J.-Q. Association between tobacco smoking and drug-resistant tuberculosis. *Infect. Drug Resist.*, 2018, Vol. 11, pp. 873-887.
68. WHO Global Tuberculosis Report 2018 Geneva. Available at: <https://www.hst.org.za/publications/NonHST%20Publications/Global%20Tuberculosis%20Act%202018.pdf>.
69. WHO Report on the global tobacco epidemic 2017. Available at: <http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/255874/9789241512824-eng.pdf?sequence=1>.
70. Willemse B.W., ten Hacken N.H.T., Rutgers B., Lesman-Leegte I.G.A.T., Postma D.S., Timens W. Effect of 1-year smoking cessation on airway inflammation in COPD and asymptomatic smokers. *Eur. Respir. J.*, 2005, Vol. 26, no. 5, pp. 835-845.
71. Wu Y., Shen Y., Zhang J., Wan C., Wang T., Xu D., Yang T., Wen F. Increased serum TRAIL and DR5 levels correlated with lung function and inflammation in stable COPD patients. *Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis.*, 2015, Vol. 10, pp. 2405-2412.
72. Zeidler R., Albermann K., Lang S. Nicotine and apoptosis. *Apoptosis*, 2007, Vol. 12, no. 11, pp. 1927-1943.
73. Zhang M.Q., Wan Y., Jin Y., Xin J.B., Zhang J.C., Xiong X.Z., Chen L., Chen G. Cigarette smoking promotes inflammation in patients with COPD by affecting the polarization and survival of Th/Tregs through up-regulation of muscarinic receptor 3 and 5 expression. *PLoS One*, 2014, Vol. 9, no. 11, e112350. doi: 10.1371/journal.pone.0112350.

Авторы:

Чумоватов Н.В. — аспирант отдела фтизиатрии ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза», Москва, Россия

Еремеев В.В. — д.м.н., руководитель отдела иммунологии ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза», Москва, Россия

Эргешов А.Э. — д.м.н., профессор, директор ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза», Москва, Россия

Authors:

Chumovатов N.V., Postgraduate Student, Department of Phthisiatrics, Central Research Institute of Tuberculosis, Moscow, Russian Federation

Eremeev V.V., PhD, MD (Medicine), Head, Immunology Department, Central Research Institute of Tuberculosis, Moscow, Russian Federation

Ergeshov A.E., PhD, MD (Medicine), Professor, Director, Central Research Institute of Tuberculosis, Moscow, Russian Federation

Поступила 03.03.2022
Принята к печати 28.03.2022

Received 03.03.2022
Accepted 28.03.2022

ЭКСПРЕССИЯ ПОВЕРХНОСТНЫХ МОЛЕКУЛ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК: ВЛИЯНИЕ БЕЛКОВЫХ ФРАКЦИЙ ЛИЗАТА МИКРОВЕЗИКУЛ ЕСТЕСТВЕННЫХ КИЛЛЕРОВ В СИСТЕМЕ *IN VITRO*

Корневский А.В.¹, Березкина М.Э.¹, Герт Т.Н.¹, Синявин С.А.¹,
Сельков С.А.^{1,2}, 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. Микровезикулы — мембранные образования размером от 100 до 1000 нм, продуцируемые различными клетками в состоянии покоя и активации, — могут передавать компоненты своего содержимого клеткам-мишеням, регулировать физиологические процессы, участвовать в развитии патологий. Среди множества клеток-источников микровезикул особый интерес представляют естественные киллеры — субпопуляция лимфоцитов, осуществляющих контактный цитоллиз вирус-инфицированных и опухолевых клеток, а также участвующих в регуляции ангиогенеза. Продуцируя различные стимуляторы и ингибиторы этого процесса, естественные киллеры способны изменять функциональную активность эндотелиальных клеток путем контактного взаимодействия с ними собственных микровезикул. Учитывая недостаточность имеющихся в литературе сведений о способности экстраклеточных везикул влиять на функциональное состояние эндотелия в зависимости от баланса передаваемых ими про- и антиангиогенных факторов, целью данного исследования явилось изучение влияния белковых фракций лизата микровезикул, продуцируемых клетками естественных киллеров линии NK-92, на фенотип и функциональные характеристики эндотелиальных клеток линии EA.hy926 в модельном эксперименте *in vitro*. В результате микропрепаративного разделения лизата микровезикул клеток линии NK-92 было получено двенадцать белковых фракций (индукторы). Установлено, что пролиферация и миграция клеток линии EA.hy926 после их культивирования в присутствии десяти из двенадцати полученных фракций, в зависимости от концентрации содержащихся в них активных

Адрес для переписки:

Корневский Андрей Валентинович
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
акушерства, гинекологии и репродуктологии имени
Д.О. Отта»
199034, Россия, Санкт-Петербург,
Менделеевская линия, 3.
Тел.: 8 (812) 328-98-91, 323-75-45.
Факс: 8 (812) 323-75-45.
E-mail: a.korenevsky@yandex.ru

Address for correspondence:

Korenevsky Andrey V.
D. Ott Institute of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive
Medicine
199034, Russian Federation, St. Petersburg,
Mendeleyevskaya Line, 3.
Phone: 7 (812) 328-98-91, 323-75-45.
Fax: 7 (812) 323-75-45.
E-mail: a.korenevsky@yandex.ru

Образец цитирования:

А.В. Корневский, М.Э. Березкина, Т.Н. Герт,
С.А. Синявин, С.А. Сельков, Д.И. Соколов «Экспрессия
поверхностных молекул и функциональные
характеристики эндотелиальных клеток: влияние
белковых фракций лизата микровезикул естественных
киллеров в системе *in vitro*» // Медицинская
иммунология, 2022. Т. 24, № 3. С. 463–480.
doi: 10.15789/1563-0625-PAF-2376
© Корневский А.В. и соавт., 2022

For citation:

A.V. Korenevsky, M.E. Berezkina, T.N. Gert, S.A. Sinyavin,
S.A. Selkov, D.I. Sokolov "Phenotypic and functional
characteristics of endothelial cells: the *in vitro* effects of
protein fractions from the lysate of natural killer-derived
microvesicles", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya
Immunologiya, 2022, Vol. 24, no. 3, pp. 463–480.
doi: 10.15789/1563-0625-PAF-2376
DOI: 10.15789/1563-0625-PAF-2376

компонентов, изменялись разнонаправленно и дозозависимо или оставались неизменными. Показан преимущественно стимулирующий эффект воздействия индукторов на пролиферацию клеток-мишеней, что свидетельствует о наличии в этих фракциях белков, регулирующих функции эндотелия. При этом остаточная площадь, не занятая мигрировавшими эндотелиальными клетками после их культивирования в присутствии индукторов, не всегда коррелировала с интенсивностью миграции и не была обратно пропорциональна количеству мигрировавших клеток. Дополнительно было установлено, что ни одна из полученных белковых фракций не оказывала влияния на экспрессию рецепторов CD54 (ICAM-1), CD34, CD31 (PECAM-1), CD119 (IFN γ R1) клетками линии EA.hy926. Полученные данные об изменении функциональных характеристик клеток линии EA.hy926 под влиянием белковых фракций лизата микровезикул, продуцируемых клетками линии NK-92, подтверждают вовлеченность этих субклеточных образований в обеспечение коммуникации естественных киллеров с клетками эндотелия и указывают на различное участие эффекторных белков, переносимых микровезикулами, в механизмах ангиогенеза.

Ключевые слова: естественные киллеры, эндотелий, иммунный ответ, ангиогенез, фенотип, пролиферация, миграция

PHENOTYPIC AND FUNCTIONAL CHARACTERISTICS OF ENDOTHELIAL CELLS: THE *IN VITRO* EFFECTS OF PROTEIN FRACTIONS FROM THE LYSATE OF NATURAL KILLER-DERIVED MICROVESICLES

Korenevsky A.V.^a, Berezkina M.E.^a, Gert T.N.^a, Sinyavin S.A.^a,
Selkov S.A.^{a, b}, Sokolov D.I.^{a, b}

^a D. Ott Institute of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

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

Abstract. Microvesicles are membrane-derived formations ranging in size from 100 to 1000 nm, being produced by a variety of resting and activated cells. They can transfer their cargo to target cells, regulate physiological processes, and participate in the development of clinical disorders. Among the microvesicles of different origin, natural killers are of special interest. They represent a subpopulation of lymphocytes that eliminate aberrant cells, including virally infected and malignant cells, and participate in regulation of angiogenesis. By producing various stimuli and inhibitors of the latter process, natural killers are able to change functional activity of endothelial cells by means of microvesicle-mediated contacts. There are only scarce literature data on ability of the extracellular vesicles to influence endothelial functions, depending on the intrinsic balance of pro- and anti-angiogenic factors. Therefore, the aim of our study was to evaluate the effect of protein fractions derived from microvesicle lysate of the NK-92 natural killer cell line upon phenotype and functional characteristics of EA.hy926 endothelial cell line under *in vitro* experimental conditions. Using chromatographic micro-preparatory separation, twelve protein fractions (inducers) were obtained from the lysate. It was found that proliferation and migration of EA.hy926 cells after their cultivation with 10 of 12 protein fractions, were changed in different directions. These effects were dose-dependent, or remained unchanged, at distinct concentrations of active components in the fractions. The inducing factors from these fractions exerted predominantly stimulating effects on proliferation of the target cells, thus suggesting presence of proteins which are able of regulating endothelial functions. However, the size of residual area free of migrating endothelial cells treated by the inducers did not always correlate with the migration intensity and did not inversely correlate with the number of migrating cells. Moreover, it was found that the obtained protein fractions had no effect upon expression of CD54 (ICAM-1), CD34, CD31 (PECAM-1) and CD119 (IFN γ R1) receptors by EA.hy926 cells. The data obtained confirm an involvement of microvesicles in communications between natural killer cells and endothelial cells, and presume different participation modes of microvesicle-derived effector proteins in the angiogenesis machinery.

Keywords: natural killer cells, endothelium, immune response, angiogenesis, phenotype, proliferation, migration

This study was supported by the Russian Foundation for Basic Research (Project Registration No. 19-015-00218: cell culture studies, preparative liquid chromatography) and was performed in the Department of Immunology and Cell Interactions, D.O. Ott Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology, St. Petersburg, Russia, partially within the institutional state assignment framework (R&D State Registration No. AAAA-A19-119021290116-1: electrophoresis).

Introduction

Natural killer (NK) cells are part of the innate arm of the immune system. They eliminate aberrant cells, including virally infected and tumorigenic cells. The main function of NK cells is implemented via the following mechanisms: exocytosis of lytic granules, ligand-mediated interaction with death receptors on target cells, secretion of cytokines, and antibody-dependent cellular cytotoxicity. NK cells are involved in physiological and pathological processes through the production of cytokines. It has been shown previously that NK cells are involved in all processes occurring in the area of uteroplacental contact during pregnancy, including implantation of a blastocyst into the endometrium, regulation of trophoblast invasion, remodeling of uterine and decidual arteries, as well as formation of the placental vascular bed [9, 14]. A significant part of research was aimed at studying the properties of decidual NK cells with the CD56^{bright}CD16⁻ phenotype, which produce a large number of pro-angiogenic factors, such as VEGF, PlGF, and CXCL8 [6, 18]. These cytokines can influence endothelial cells (ECs) and their microenvironment, controlling angiogenesis. It is believed that NK cells prepare uterine spiral arteries for remodeling, inducing Fas-dependent apoptosis of smooth muscle cells and ECs [3].

In vitro model experiments have yielded conflicting data on the effect of NK cells on angiogenesis. There is evidence in favor of stimulating endothelial cell migration and formation of vessels [18, 22], and in favor of inhibiting the processes of angiogenesis [12, 15]. It was found that IL-15 enhances the production of VEGF and PlGF by NK cells [19, 25] and, on the contrary, NK cells activated by IL-12 suppress vascular growth due to the production of IFN γ , IP-10, perforin, and granzyme [38]. Thus, depending on the experimental model used or characteristics of NK cells obtained from different sources, researchers have come to opposite conclusions regarding the effect of NK cells on the endothelium.

In addition to contact interactions or cytokine production, NK cells can also implement their cytotoxic and regulatory functions through the microvesicles (MVs) they produce. MVs are mem-

brane formations ranging in size from 100 to 1000 nm and are produced by a variety of resting and activated cells. These formations can transfer their cargo to target cells, regulate inflammation, coagulation, antigen presentation, and apoptosis, as well as participate in the pathogenesis of diseases and inflammatory processes [7, 17]. MVs of leukocyte origin, as a minor part of MVs in the blood flow under physiological conditions [11], remain the least studied population. With pathologies, their level in the blood plasma increases sharply, therefore, leukocyte MVs are considered as markers of various diseases [31, 35]. The role of MVs (including those produced by NK cells) in angiogenesis, inflammation, and the immune response has been insufficiently studied.

Previously, we have shown altered expressions of the CD54 (ICAM-1), CD34, CD31 (PECAM-1) and CD119 (IFN γ R1) receptors by the EA.Hy926 endothelial cell line, as well as the appearance of the pan-leukocyte marker molecule CD45 on the target cell membrane after co-cultivation of ECs with NK-92 cell derived MVs [29]. In particular, incubation of the target cells in the presence of the MVs reduced the relative number of ECs expressing the CD34, CD31 and CD119 receptors. Besides, the decreased number of ECs with the CD34⁺ phenotype after incubation with the MVs correlated with the increased intensity of the receptor expression by the target cells as compared to intact cells. Despite the fact that no differences were found in the number of ECs with the CD54⁺ phenotype, the intensity of this receptor expression by the cells was higher after their incubation with the MVs compared to intact cells [29]. We have also shown increased dose-dependent proliferation of the target cells after cultivation in the presence of the same MVs as compared to intact cells [29]. Additionally, decreased endothelial cell migration under the same conditions was found, and that was caused by a decrease in the number of migrated ECs compared to the cultivation of the target cells in the absence of the MVs [29].

The literature data on the ability of MVs to influence the functions of the endothelium, depending on the balance of pro- and anti-angiogenic factors they carry, are still scarce. Therefore, considering the ability of NK-92 cell derived MVs to change the functionality of ECs and their response to external signals, **the aim of this study** was to evaluate the effect of protein fractions of the NK-92 cell derived MV lysate on the phenotype and functional characteristics of EA.hy926 cells in an *in vitro* experiment.

Materials and methods

Cells and cell culture

The cells of the NK-92 cell line and the EA.hy926 cell line (American Tissue Culture Collection, USA)

were cultured using standard cell culture procedures under the damp atmosphere at 37 °C and 5% CO₂ as per instructions provided by the manufacturer. NK-92 cells reproduce the main phenotypic and functional characteristics of activated NK cells [16], while EA.hy926 cells reproduce the main morphological, phenotypic and functional characteristics inherent in macrovascular ECs [37]. Cell vitality was evaluated by trypan blue staining and was not less than 96%.

Inducers

Protein fractions of the NK-92 cell derived MV lysate obtained using micropreparative size exclusion liquid chromatography of medium pressure were used as inducers of EA.Hy926 cells (see below). Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA, Sigma-Aldrich Chem. Co., USA) at a concentration of 10 ng/ml was used as a positive control for stimulation of EA.Hy926 cells.

Isolation of biomaterial

There being no single standard protocol available for MV isolation and characterization, a variety of methodological approaches are currently used to obtain MV fractions with proper purity and enrichment [26]. Therefore, the MVs shed from NK-92 cells were isolated by the modified step-wise centrifugation method [36] in Hanks's solution without Ca²⁺ and Mg²⁺ (Sigma-Aldrich Chem. Co., USA), for which the supernatants were sequentially centrifuged at 200 g (4 °C, 10 min.) and 9,900 g (4 °C, 10 min.). After the second centrifugation, the pellet was washed twice with cold phosphate buffer solution (PBS; Sigma-Aldrich Chem. Co., USA) and was recentrifuged at 19,800 g (4 °C, 20 min.). The supernatant was discarded, with the pellet washed several times with cold PBS, each time precipitating the MVs by centrifugation at 19,800 g (4 °C, 20 min.). The purified pellet was resuspended in MilliQ deionized water, with the protease inhibitor mixture (cOmplete, EDTA-free; Roche Diagnostics GmbH, Germany) added at the concentration specified by the manufacturer, and was stored at -80 °C until being analyzed. This protocol allows for isolating MVs with a diameter of 100-200 nm with sufficient purity and minimal biomaterial loss, as MVs are sequentially separated from coarse particles of cellular debris and large apoptotic bodies, as well as from exosomes [24].

On the day of the experiment, the frozen MVs were thawed and subjected to repeated "freeze-thaw" cycles five times, followed by being intensively homogenized in a glass homogenizer for 5 min. The debris was removed by centrifugation at 16,000 g (4 °C, 10 min.), the supernatant being collected for further investigation.

Preparative chromatography

To obtain protein fractions of the NK-92 cell derived MV lysate, a medium pressure liquid NGC

chromatograph with ChromLab™ Software (Bio-Rad Laboratories, USA) was used. Chromatographic separation was carried out under non-denaturing conditions on an ENrich™ SEC 650 High-Resolution Size Exclusion Column, 10 × 300 mm, 24 ml, 10 μm (Bio-Rad Laboratories, USA). Fresh PBS supplemented with 0.5 M sodium chloride (Sigma-Aldrich Chem. Co., USA) (pH 7.4) was used as a mobile phase. The analysis was performed in an isocratic mode at room temperature with a mobile phase flow rate of 0.5 ml/min and a detector wavelength of 280 nm. The analysis run time was 60 min. Protein fractions of the lysate of the MVs derived from 6.5×10^8 NK-92 cells were isolated and sterilized through a Millex-GV4 membrane filter with a pore diameter of 0.22 μm (Merck Millipore, USA), followed by being frozen at -80 °C and stored for no more than two weeks until being analyzed.

Electrophoresis

Samples of the obtained MV lysate fractions were separated by microarray electrophoresis under non-denaturing conditions using commercial High Sensitivity Protein Chips (Agilent Technologies, USA) in an Agilent 2100 bioanalyzer (Agilent Technologies, USA) as per instructions provided by the manufacturer. The intensities of the bands were assessed using the Agilent 2100 Expert software (Agilent Technologies, USA). All samples were run in triplicate.

Assessment of cytotoxicity

To determine the minimum toxic doses of the mobile phase for chromatography and the obtained MV lysate fractions, EA.hy926 cells were pipetted and transferred into the wells of a 96-well cell clear flat bottom culture plate (BD, USA) at a concentration of 3.5×10^3 cells per well in 100 μl of complete culture medium supplemented with 10% inactivated fetal calf serum (FCS). To avoid the edge effect in this and all further experiments, the outer wells along the entire perimeter were filled with the medium and were not used subsequently. The cells were then cultured for 24 h using standard cell culture procedures under the damp atmosphere at 37 °C and 5% CO₂. Following that, the culture medium in the wells was replaced with the mobile phase for chromatography or the obtained protein fractions in several dilutions. For this, by sequential titration on complete culture medium supplemented with 10% FCS, series of dilutions of the mobile phase and the protein fractions were prepared in the following ratios: 50%, 25%, 20%, 10%, 5%, 2.5%, 1.25%, 0.625%, 0.313%, 0.156%, and 0.078%. To obtain statistically reliable results, each dilution was prepared in six replicas. The culture medium supplemented with 10% FCS was used as a control. Then, the cells were cultured for 24 h using

standard cell culture procedures under the damp atmosphere at 37 °C and 5% CO₂. On the following day, the culture medium was removed and the cells were stained with 0.2% crystal violet solution (Sigma-Aldrich Chem. Co., USA) containing 5% methanol, for which 0.1 ml of the dye solution was added to each well and incubated for 10 min. After washing the wells four times with distilled water, the plate was dried up to completely remove moisture, and the dye was extracted by adding 0.1 ml of 50% acetic acid solution to each well. The optical density was measured using an ELx808 microplate photometer (BioTek Instruments Inc., USA) at a wavelength of 540 nm (cutoff wavelength of 630 nm). The decrease in cell viability was judged by optical density changes compared to the control.

Evaluation of the minimum toxic dose of the mobile phase for chromatography in relation EA.hy926 cells showed that the mobile phase was toxic when undiluted or diluted with the culture medium in ratios of 50% and 25% (the difference from the viability of intact cells: $p < 0.001$). When diluted with the culture medium in ratios starting from 12.5%, the mobile phase had no toxic effect on EA.hy926 cells (the difference from the viability of intact cells: $p > 0.05$).

The toxicity of the obtained MV lysate fractions towards EA.hy926 cells was also preliminary assessed: undiluted and diluted fractions were not toxic towards the cells.

Evaluation of cell proliferation

To assess the effect of protein fractions of the NK-92 cell derived MV lysate on proliferation of EA.hy926 cells, we used a method based on staining the protein components of the cell cytoplasm with the vital dye crystal violet. This method is comparable in sensitivity to other methods for assessing proliferation [2]. For this, the cells were pipetted and transferred into the wells of a 96-well cell clear flat bottom culture plate at a concentration of 5.0×10^3 cells per well in 0.1 ml of complete culture medium supplemented with 10% FCS for 24 h to adhere to the plate surface. On the following day, the culture medium was removed and the wells were washed with an excessive amount of pre-warmed HBSS solution (Sigma-Aldrich Chem. Co., USA), followed by the solution removal. Then, 0.1 ml of inducer solutions (diluted protein fractions of the NK-92 cell derived MV lysate) prepared in the culture medium without FCS were added to the wells, the final concentrations of each fraction being 10%, 5%, 2.5%, 1.25%, 0.625%, 0.313%, 0.156%, and 0.078%. Following that, FCS was added to each well in an amount equal to 2.5% of the well contents, with the outer wells filled with pre-warmed HBSS solution. After incubation for 72 h, the culture medium was removed and the cells were stained with 0.2% crystal

violet solution, as described above. After the plate was dried up, the dye was extracted by adding 0.1 ml of 50% acetic acid solution to each well.

The intensity of cell proliferation was assessed by the change in the optical density of the stained solutions, which was measured using an ELx808 microplate photometer at a wavelength of 540 nm (cutoff wavelength of 630 nm). The obtained optical densities were matched with the number of cells using the titration curve, and the results were expressed in the number of cells. The change in cell proliferation was judged by the change in both the optical density of the sample and the number of cells compared to incubation in the culture medium supplemented with 2.5% FCS (control). The culture media supplemented with 0% and 10% FCS were used as additional controls. All samples were run in triplicate. Each protein fraction was analyzed in four repetitions for each dilution.

Assessment of cell migration

To assess the effect of protein fractions of the NK-92 cell derived MV lysate on migration of EA.hy926 cells, the cells were pipetted and transferred into the wells of a 96-well cell clear flat bottom culture plate at a concentration of 3.5×10^4 cells per well in 0.1 ml of complete culture medium supplemented with 10% FCS for 24 h. On the following day, a vertical line was drawn from the upper edge to the lower one of each well using a 300 µl thin plastic tip, and the wells were washed three times with pre-warmed HBSS solution. Then, 0.1 ml of inducer solutions (diluted protein fractions of the NK-92 cell derived MV lysate) prepared in the culture medium supplemented with 10% FCS were added to the wells, the final concentrations of each fraction being 10%, 5%, 2.5%, 1.25%, 0.625%, 0.313%, 0.156%, 0.078%, 0.039%, and 0.020%.

Control wells containing cells without the protein fractions added were photographed using an Axio Observer Z1 microscope and an AxioCam MRc 5 camera (Carl Zeiss Industrielle Messtechnik GmbH, Germany), capturing the initial line width. The prepared plates were then incubated for 24 h. On the following day, the culture medium was removed, and the cells were stained with 0.2% crystal violet solution, as described above. After washing the wells five times with distilled water, the plates were dried up for 24 h at 37 °C to completely remove moisture and were photographed to obtain three fields of view from each well. In each plate, the initial line width was measured and the average value was calculated.

The data obtained were analyzed using the patented MarkMigration software (Russia) [28], which automatically accounts both the number of cells that migrated into the zone of the disturbed monolayer and

the residual area within the boundaries of the zone. Cell migration was assessed by the change in these two parameters in comparison with the control (complete culture medium supplemented with 10% FCS). All samples were run in triplicate. Each protein fraction was analyzed in four repetitions for each dilution.

Flow cytometry

To evaluate the effect of protein fractions of the NK-92 cell derived MV lysate on the phenotype of EA.hy926 cells, the cells were transferred into the wells of a 24-well cell clear flat bottom culture plate (BD, USA) at a concentration of 1.8×10^5 /ml of complete culture medium supplemented with 10% FCS and were cultured for 24 h before reaching confluence. The culture medium was then removed so that when the protein fractions were added, the total volume in the well was 0.45 ml. After that, 0.05 ml of the undiluted protein fractions were added to some of the wells. To control the effect of the mobile phase for chromatography on the phenotype of EA.hy926 cells, the mobile phase at a concentration of 12.5%, which was not toxic to the cells, was added to the other wells. Part of EA.hy926 cells was incubated in the wells in complete culture medium containing no inducers. As a positive control, the cells were cultured in complete culture medium in the presence of PMA (10 ng/ml). On the following day, the cell monolayer was disintegrated with pre-warmed Versene solution and was washed three times in Cell Wash solution (BD, USA). The cells were then treated with antibodies to the CD54 (ICAM-1), CD34, CD31

(PECAM-1) adhesion receptors and the CD119 IFN γ receptor in accordance with the manufacturer's recommendations (BD, USA). Isotypic antibodies were used to control nonspecific binding of antibodies as per the manufacturer's recommendations (BD, USA). The relative number and the intensity of the CD54, CD34, CD31 and CD119 receptor expression by EA.hy926 cells were assessed using a FACS Canto II flow cytometer (BD, USA). All samples were run four times. Each protein fraction was analyzed in duplicate for each dilution.

Statistical analysis

Statistical processing of the obtained data was carried out using the nonparametric Mann–Whitney and Kruskal–Wallis tests in the STATISTICA 10 and GraphPad Prism 8 programs. The data are presented as median (first quartile - third quartile). Figures, tables, and diagrams illustrate the changes in the studied parameters compared to the control, error bars showing the minimum and maximum data values. A p value of less than 0.05 was considered statistically significant.

Results

Micropreparative separation of the NK-92 cell derived MV lysate and electrophoresis of the obtained protein fractions

A lysate protein profile of the MVs produced by NK-92 cells that consisted of twelve fractions was obtained using chromatographic separation (Figure 1).

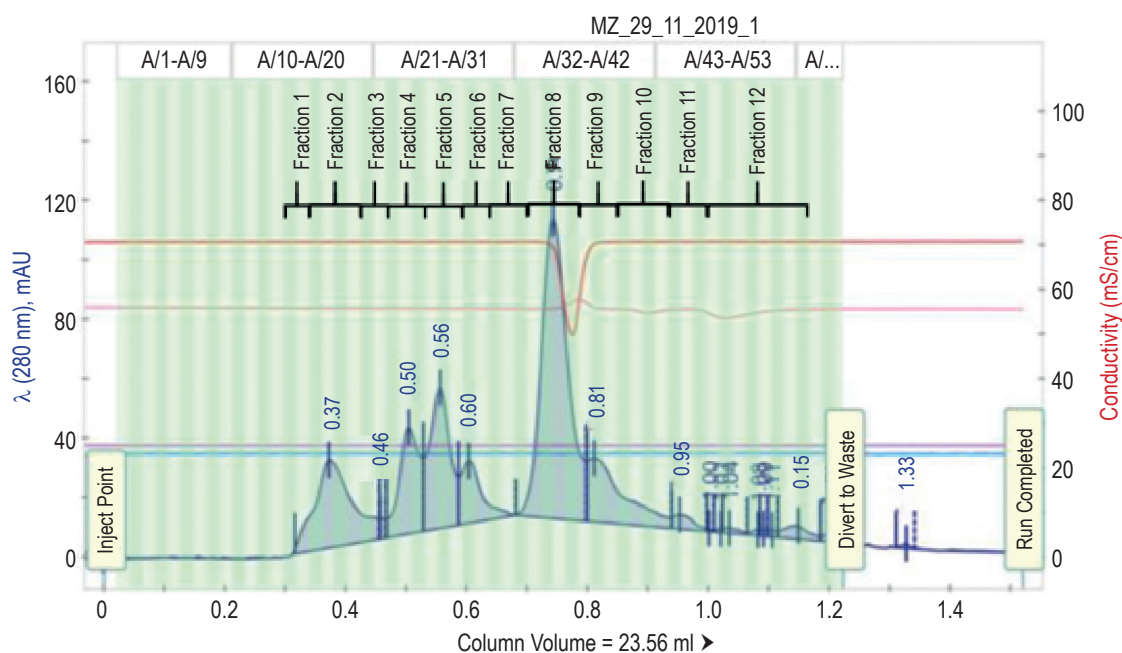


Figure 1. Chromatographic profile of the NK-92 cell derived MV lysate

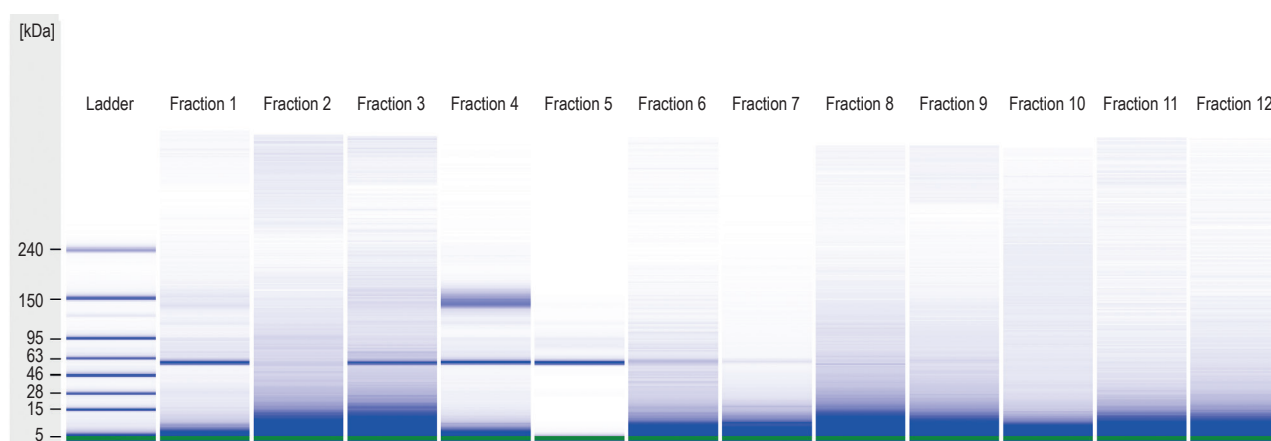


Figure 2. Electropherograms of the protein fractions of the NK-92 cell derived MV lysate

The following electrophoretic separation of proteins in the obtained fractions showed the molecular weight (MW) distribution of major (constituting more than 5% of the total profile) bands, as presented below. Fractions 1 and 3 contained a group of proteins with an average MW 59-60 kDa (100%); fraction 4 comprised groups of proteins with MW 60 kDa (55.9%) and 143 kDa (44.1%); fraction 5 contained a more diverse composition, in which groups of proteins with MW 62 kDa (88.5%), 84 kDa (6.4%) and 95 kDa (5.1%) were distinguished; fraction 6 included two major bands with MW 10 kDa (85.1%) and 14 kDa (10.6%), as well as fraction 7 with MW 10 kDa (91.5%) and 17 kDa (7.5%). The rest of the protein fractions contained minor components with an unknown average MW (fraction 2) or a MW lesser than 15 kDa (fractions 8-12) (Figure 2).

Evaluation of the effect of protein fractions of the NK-92 cell derived MV lysate on proliferation of EA.hy926 cells

In a preliminary experiment undertaken to verify the correctness of the data obtained, it was shown that proliferation of non-activated EA.hy926 cells cultured in complete growth medium supplemented with 2.5% inactivated FCS (control: 19721 (18662-21686) cells per well) differed from that of the cells cultured in the absence of FCS (first additional control: 4301 (3863-5159) cells per well; $p < 0.001$) and in the presence of 10% FCS (second additional control: 34837 (32356-36018) cells per well; $p < 0.001$), which indicated the optimal conditions for the subsequent tests.

It was found that ten out of twelve protein fractions of the NK-92 cell derived MV lysate changed the EA.hy926 cell proliferation pattern in comparison with the spontaneous cultivation (Figure 3). When compared to the control (non-activated ECs), the

number of proliferated ECs increased 1.04-1.62 times after cultivation in the presence of the protein fractions at concentrations: 10% (fractions 1, 6, 9, 10, and 12); 5% (fractions 1, 3, 4, 6, 9, and 12); 2.5% (fractions 2-4, 6, and 9); 1.25% (fractions 2-4, 6, and 9); 0.625% (fractions 2-4, and 9); 0.313% (fractions 1-4); 0.156% (fractions 1, 3, and 4) and 0.078% (fractions 1, 3, and 4). Besides, it was found that this parameter decreased 1.03-1.16 times after culturing ECs in the presence of the fractions at concentrations: 10% and 5% (fraction 8); 0.313% and 0.078% (fraction 11).

In addition, it was found that after culturing EA.hy926 cells in the presence of fractions 1, 2, 6, 8-10, and 12, proliferation of the cells changed in a dose-dependent manner until the observed effect disappeared (Figure 3). This parameter was 1.11-1.62 times higher after cultivation of ECs in the presence of proliferation-stimulating fractions 1, 2, 6, 9, 10, and 12 at initial concentrations of 10%, 5% and 2.5%, than after cultivation in the presence of the same fractions in stronger dilutions. A similar tendency was shown in relation to proliferation-inhibiting fraction 8, the successive dilution of which gradually neutralized the observed effect.

Fractions 5 and 7 had no effect on proliferation of the target cells (Figure 3).

To sum up, the data obtained in this part of the experiment indicate a multidirectional (mainly stimulating) effect of protein fractions of the NK-92 cell derived MV lysate on proliferation of the endothelium.

Evaluation of the effect of protein fractions of the NK-92 cell derived MV lysate on migration of EA.hy926 cells

In a preliminary experiment undertaken to check the correctness of the data obtained, it was shown that the median (first quartile - third quartile) of the

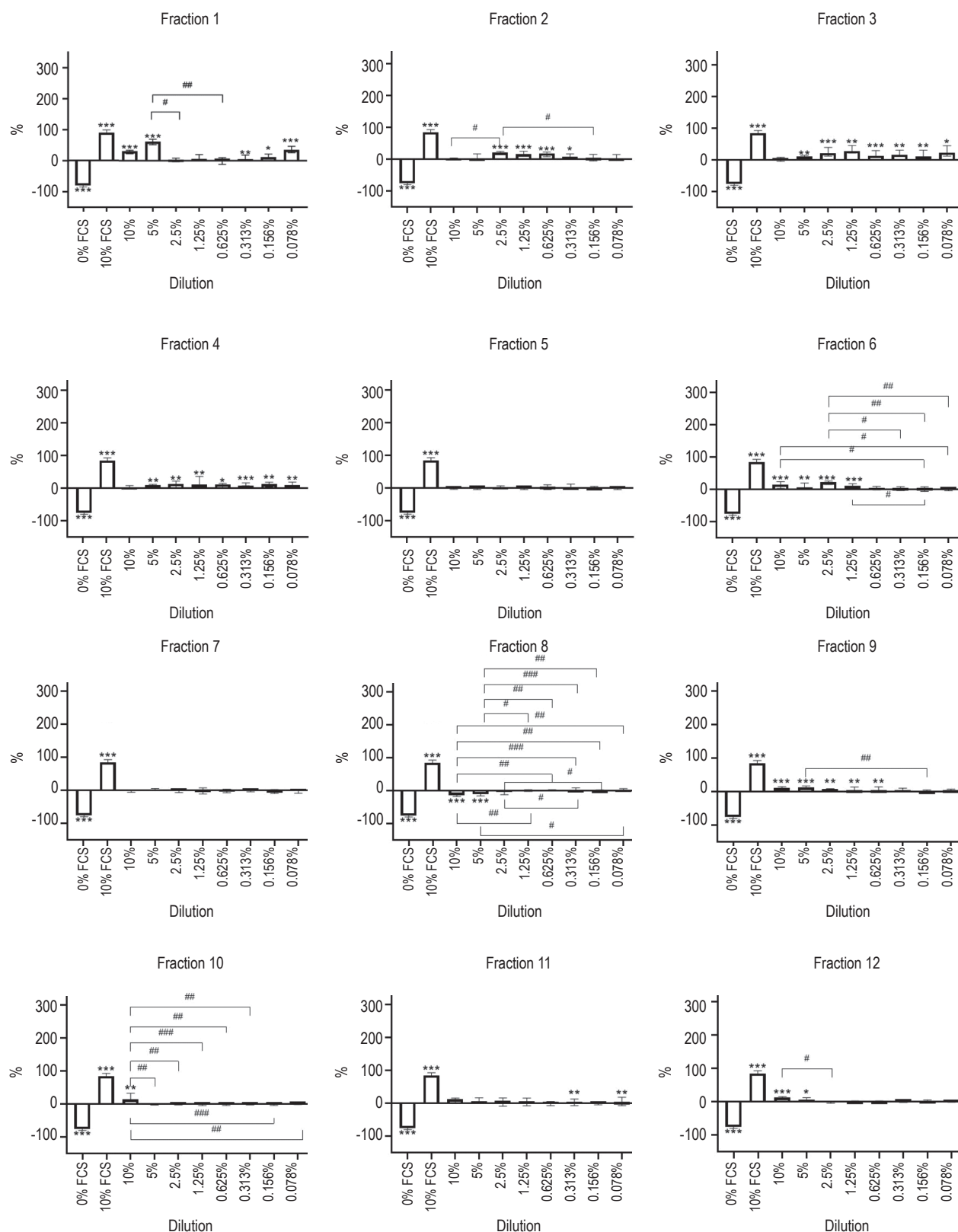


Figure 3. Proliferation of EA.hy926 cells under different cell cultivation conditions in the presence of the protein fractions of the NK-92 cell derived MV lysate (% of proliferation of the non-activated cells)

Note. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ (compared to the non-activated cells); # $p < 0.05$; ## $p < 0.01$; ### $p < 0.001$ (compared to the cells after culturing in the presence of the same fraction at two different concentrations).

area of the initial line after scraping the monolayer was 1.07 (1.02-1.15) mm², with no cells found in the area of the disturbed monolayer. The culture medium supplemented with 10% FCS was used as a control: the median (first quartile - third quartile) of the number of migrated cells was 373.6 (298.8-450.1), that of the residual area being 0.46 (0.37-0.56) mm², which differed from the residual area of the monolayer immediately after drawing the line ($p < 0.001$).

As in the case of the proliferation study, migration of EA.hy926 cells after their being cultured in the presence of the inducers changed in different directions or remained unchanged (Figure 4). When compared to the control (non-activated ECs), the number of migrated ECs increased 1.13-1.27 times after cultivation in the presence of the protein fractions at concentrations: 10% (fraction 3); 5% (fraction 11); 2.5% (fraction 5); 1.25% (fraction 11); 0.625% (fractions 1 and 11); 0.313% (fractions 10 and 11); 0.156% (fraction 1); 0.039% (fractions 1, 3, and 9) and 0.020% (fraction 5). It was also found that this parameter decreased 1.08-1.57 times after cultivation of ECs in the presence of the fractions at concentrations: 10% (fractions 2, 6, 10, and 12); 5% (fractions 2, 6, and 12); 2.5% (fraction 6); 1.25% (fractions 6 and 12); 0.625% (fraction 6); 0.313% (fractions 4 and 6); 0.156% (fractions 6 and 12); 0.078% (fractions 2, 6, and 12) and 0.020% (fraction 6).

It should also be noted that when fractions 3-5, 9, and 10 were used as inducers, only single changes in migration of EA.hy926 cells were found depending on the concentration of the inducer, while when fractions 1, 2, 6, 11, and 12 were used, more significant and frequent variations of this parameter were observed. Moreover, of all the fractions, fraction 6 showed the most prominent effect: all dilutions, with the exception of 0.039%, decreased the number of migrated cells.

Dose-dependent effects of the inducers on migration of EA.hy926 cells were observed only, when fraction 10 was used (Figure 4). Upon reaching the minimum endothelial cell migration after cultivation in the presence of the fraction at a concentration of 10%, its further dilution caused a sequential increase in the number of migrated cells by 1.35-1.45 times.

Fractions 7 and 8 had no effect on migration of the target cells (Figure 4).

It was also found that the residual area not occupied by migrated EA.hy926 cells after culturing them in the presence of the inducers did not always correlate with the migration rate and was not inversely proportional to the number of the migrated cells (Figure 5). When compared to the control (non-activated ECs), the area not occupied by migrated cells decreased 1.15-1.46

times after their cultivation in the presence of the fractions at concentrations: 10% (fraction 3); 5% (fraction 11); 2.5% (fraction 5); 1.25% (fraction 11); 0.625% and 0.313% (fractions 3, 10, and 11); 0.156% (fraction 1); 0.078% (fraction 9); 0.039% (fractions 1, 7, and 9) and 0.020% (fraction 5). An increase in this parameter by 1.04-1.41 times was observed after cultivation of ECs in the presence of the fractions at concentrations: 10% (fractions 6-9 and 12); 5%, 1.25%, 0.625%, and 0.313% (fraction 6), and 0.078% (fractions 2 and 6), with this effect observed in more than half of the studied concentrations when using fraction 6.

Fraction 4 did not affect the residual area (Figure 5).

Serial dilution of the inducers during cultivation of EA.hy926 cells also revealed some dose-dependent effects on the residual area not occupied by the migrated cells (Figure 5). For example, the area decreased by 1.49 times, when fraction 12 was diluted in the concentration range from 10% to 2.5%. This effect gradually leveled off with a further sequential decrease in the concentration of the inducer down to 0.020%, reaching a value of 81.7% compared to that, when using the fraction at a concentration of 10%.

To sum up, the data obtained in this part of the experiment indicate a multidirectional effect of the protein fractions of the NK-92 cell derived MV lysate on migration of the endothelium.

Evaluation of the effect of protein fractions of the NK-92 cell derived MV lysate on the phenotype of EA.hy926 cells

In a preliminary experiment undertaken to select the optimal conditions for subsequent tests, it was shown that the mobile phase for chromatography had no effect on the autofluorescence of EA.hy926 cells. Cultivation of the target cells in the presence of the mobile phase did not alter their expression of the CD54, CD34, CD31 and CD119 receptors.

After culturing EA.hy926 cells in the presence of PMA, the expression intensity of the CD54, CD34 and CD119 receptors was higher, and that of the CD31 receptor was lower, when compared to the non-activated cells (Table 1). The same changes were observed, when determining the relative number of cells expressing these receptors (Table 2).

It was found that the protein fractions of the NK-92 cell derived MV lysate did not affect the expression of the CD54, CD34 and CD119 receptors by the target cells (Tables 1, 2).

Discussion

In this study, using size exclusion chromatography, protein fractions of the NK-92 cell derived MV lysate

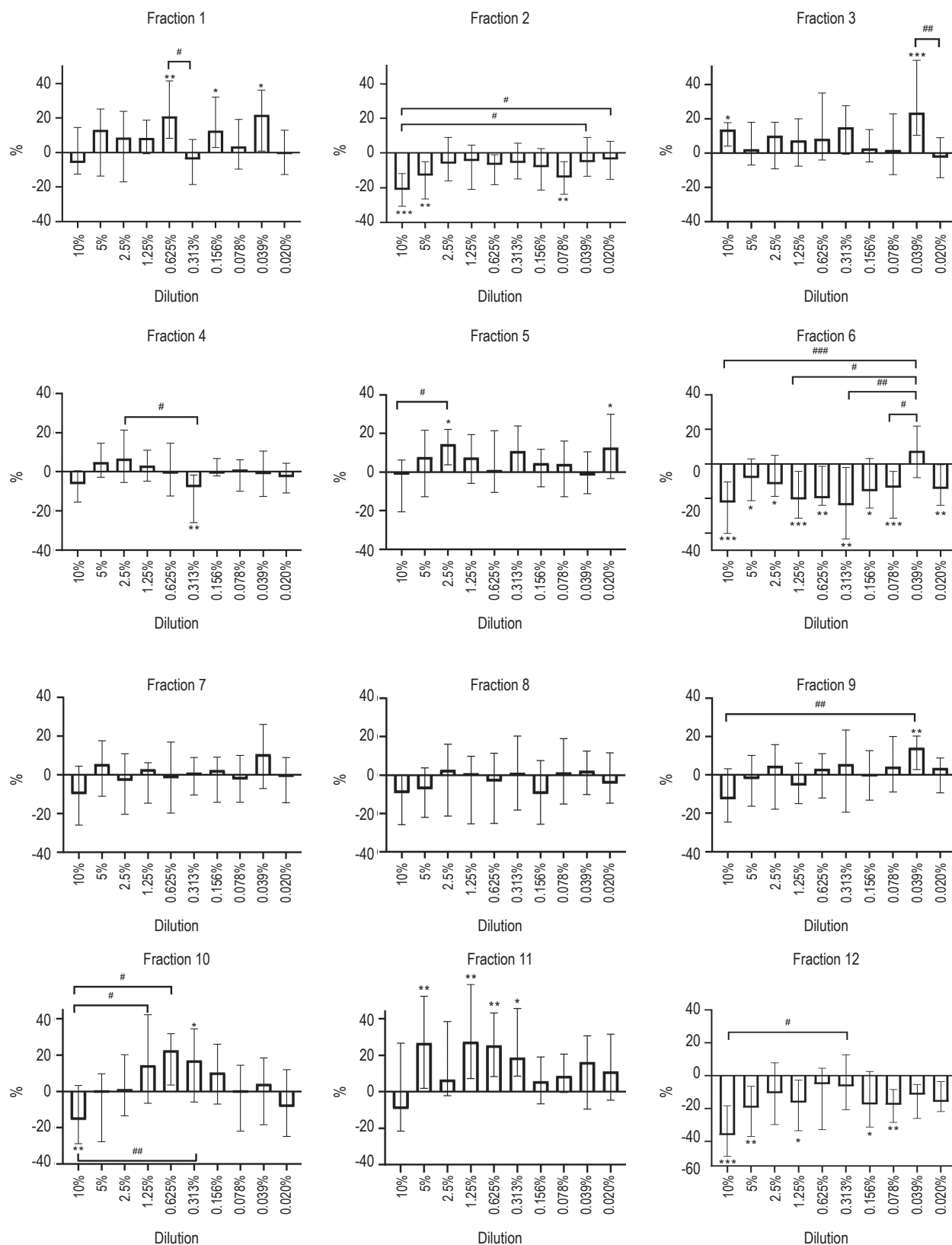


Figure 4. Number of EA.hy926 cells that migrated to the area of the disturbed monolayer under different cell cultivation conditions in the presence of the protein fractions of the NK-92 cell derived MV lysate (% of the non-activated cells; the abscissa shows the content of the fraction in the culture medium in serial dilutions)

Note. As for Figure 3.

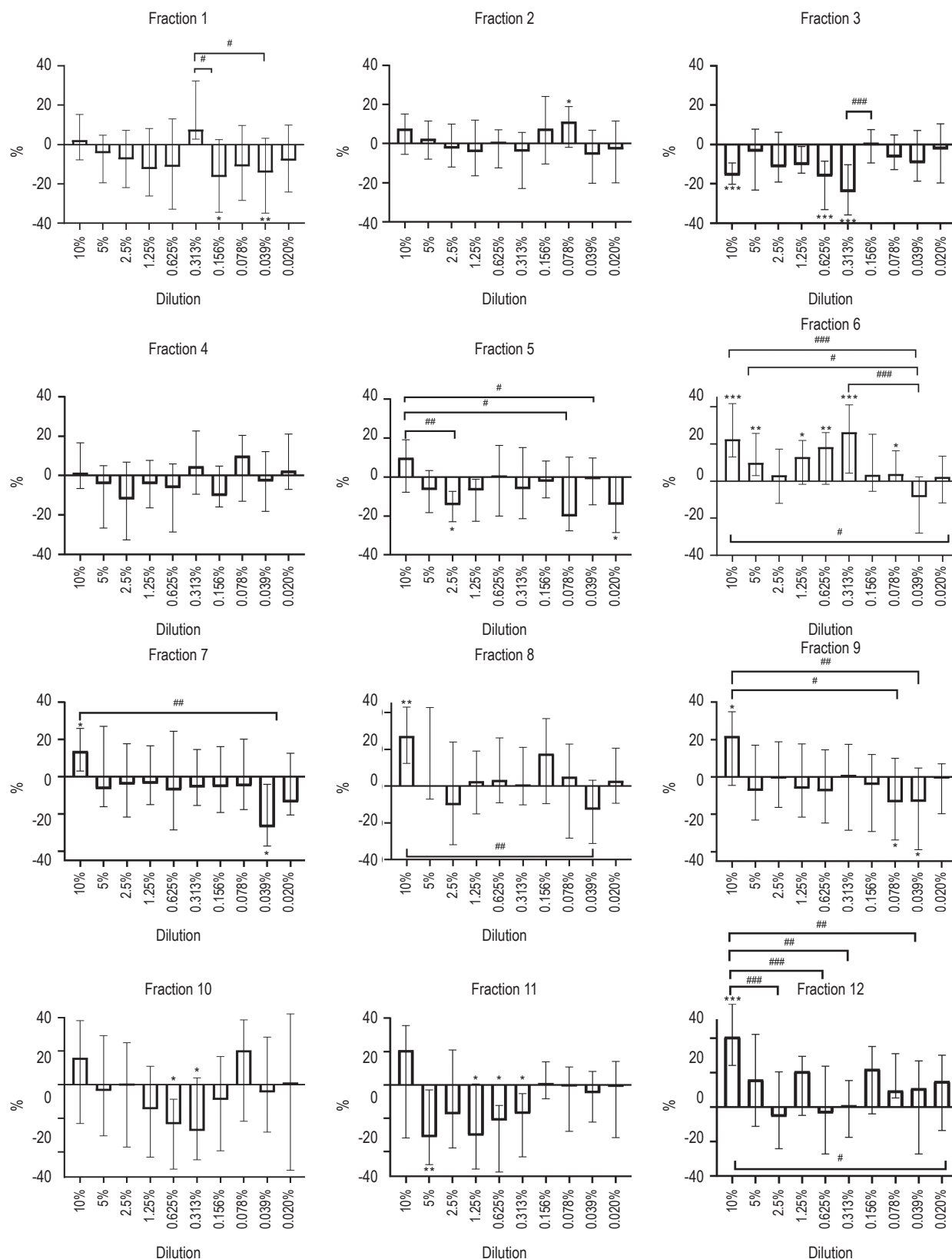


Figure 5. Residual area after EA.hy926 cells migrated to the area of the disturbed monolayer under different cell cultivation conditions in the presence of the protein fractions of the NK-92 cell derived MV lysate (% of the residual area not occupied by the non-activated cells; the abscissa shows the content of the fraction in the culture medium in serial dilutions)

Note. As for Figure 3.

TABLE 1. MEAN FLUORESCENCE INTENSITY OF CD54, CD34, CD31 AND CD119 RECEPTOR EXPRESSION BY EA.hy926 CELLS UNDER DIFFERENT CELL CULTIVATION CONDITIONS IN THE PRESENCE OF PROTEIN FRACTIONS OF THE NK-92 CELL DERIVED MICROVESICLE LYSATE

Cell cultivation conditions	Receptor expression intensity (MFI)			
	CD54	CD34	CD31	CD119
ECs (control)	2568 (1862-3200)	0 (0-0)	877 (790-1002)	489 (330-568)
ECs + mobile phase for chromatography	2468 (2292-2503)	0 (0-0)	505 (480-922)	25 (3-723)
ECs + PMA	5604 (5196-6224)***	188 (55-459)**	148 (108-171)***	756 (606-1081)*
ECs + fraction 1	2615 (2288-3409)	2 (0-13)	659 (581-1549)	563 (302-604)
ECs + fraction 2	2478 (2467-2924)	14 (0-65)	630 (559-1761)	417 (352-648)
ECs + fraction 3	2548 (2196-2645)	0 (0-137)	636 (542-1248)	471 (356-661)
ECs + fraction 4	2584 (2410-2761)	45 (0-141)	768 (623-1708)	605 (324-660)
ECs + fraction 5	2948 (2731-3041)	0 (0-27)	731 (647-1883)	453 (289-630)
ECs + fraction 6	2646 (2256-2846)	76 (0-111)	704 (606-1967)	540 (221-681)
ECs + fraction 7	2596 (2545-2821)	98 (0-253)	731 (604-1496)	640 (469-694)
ECs + fraction 8	2443 (2310-2698)	0 (0-71)	622 (494-1874)	512 (338-634)
ECs + fraction 9	2720 (2682-3079)	44 (0-82)	723 (560-1844)	611 (411-634)
ECs + fraction 10	2675 (2380-2804)	46 (0-89)	622 (547-2217)	598 (416-651)
ECs + fraction 11	2770 (2482-2998)	19 (0-142)	668 (553-2013)	592 (264-709)
ECs + fraction 12	2748 (2363-3089)	0 (0-39)	663 (554-2038)	506 (209-703)

Note. ECs, non-activated EA.hy926 cells; PMA, phorbol 12-myristate 13-acetate (10 ng/ml). *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$ (compared to the non-activated cells expressing the same receptor).

TABLE 2. RELATIVE NUMBER OF EA.hy926 CELLS EXPRESSING CD54, CD34, CD31 AND CD119 RECEPTORS UNDER DIFFERENT CELL CULTIVATION CONDITIONS IN THE PRESENCE OF PROTEIN FRACTIONS OF THE NK-92 CELL DERIVED MICROVESICLE LYSATE

Cell cultivation conditions	Relative number of cells expressing receptors (%)			
	CD54	CD34	CD31	CD119
ECs (control)	59.6 (53.2-62.9)	0.0 (0.0-1.1)	44.0 (40.4-50.1)	30.8 (19.6-35.9)
ECs + mobile phase for chromatography	59.5 (59.4-59.7)	0.0 (0.0-0.9)	35.0 (2.8-48.3)	16.2 (4.9-19.9)
ECs + PMA	80.7 (79.5-82.8)***	17.6 (2.9-34.5)**	4.1 (2.9-5.5)***	49.9 (38.0-70.5)*
ECs + fraction 1	62.4 (58.4-66.2)	1.0 (0.0-1.4)	31.2 (28.0-65.6)	32.2 (17.5-37.1)
ECs + fraction 2	62.5 (59.7-64.5)	3.2 (0.0-4.2)	30.6 (27.6-69.7)	25.8 (21.5-42.9)
ECs + fraction 3	60.3 (56.3-62.2)	0.0 (0.0-11.7)	31.0 (25.3-55.8)	29.5 (23.0-40.4)
ECs + fraction 4	61.1 (59.1-63.3)	1.1 (0.0-5.9)	34.1 (30.7-69.0)	36.8 (18.6-39.1)
ECs + fraction 5	64.7 (62.7-68.8)	0.0 (0.0-4.2)	34.6 (31.5-73.0)	27.9 (17.0-43.2)
ECs + fraction 6	61.2 (57.1-66.5)	4.1 (0.0-9.7)	32.8 (28.7-72.2)	28.9 (11.6-48.4)
ECs + fraction 7	61.1 (59.6-65.3)	4.8 (0.0-10.3)	33.2 (27.9-59.7)	35.3 (24.4-40.5)
ECs + fraction 8	59.1 (57.1-63.8)	0.0 (0.0-2.2)	29.8 (25.1-69.8)	33.6 (16.8-40.8)
ECs + fraction 9	61.3 (58.9-67.1)	4.3 (0.0-5.6)	30.9 (25.3-68.7)	36.8 (22.4-41.4)
ECs + fraction 10	59.2 (58.0-68.0)	3.5 (0.0-4.3)	29.2 (26.1-76.5)	34.0 (23.7-40.2)
ECs + fraction 11	61.4 (59.8-67.2)	0.9 (0.0-2.7)	31.9 (27.0-74.7)	32.9 (14.8-40.3)
ECs + fraction 12	62.3 (57.0-69.0)	0.0 (0.0-3.2)	31.5 (24.9-76.2)	27.1 (10.2-40.5)

Note. As for Table 1.

were obtained, which were further characterized by weight using capillary gel electrophoresis on microchips. The obtained fractions are represented by groups of proteins with different molecular weights, the average values of which are in the range of 5-250 kDa. The quality of the distribution of protein groups by fractions indicates a satisfactory chromatographic separation of the lysate, which is proven by broad absorption and fluorescence bands spanning several neighboring fractions. The obtained result also reflects a wide variety of proteins in the composition of the NK-92 cell derived MV lysate (including cytokines, cell adhesion regulators, intracellular signaling proteins), which we previously identified as candidate proteins using MALDI-TOF mass spectrometric analysis [23].

The aim of this study was to evaluate the effect of the obtained protein fractions of the NK-92 cell derived MV lysate on the phenotype and the functional characteristics of the EA.Hy926 cell line. Previously, we have found that the cultivation of ECs in the presence of NK-92 cell derived MVs increased endothelial cell proliferation in a dose-dependent manner, when compared with cultivation in a medium without MVs [29]. Besides, we have found decreased endothelial cell migration under the same conditions, which was caused by a decrease in the number of migrated ECs compared to the cultivation of the target cells in the absence of MVs [29]. Therefore, the next stage of our study was the assessment of the effect of the protein fractions of the NK-92 cell derived MV lysate on proliferation and migration of EA.Hy926 cells.

In this study, it was found that ten out of the twelve protein fractions of the MV lysate cause a multidirectional change in endothelial cell proliferation as compared to cultivation in a medium that did not contain the inducers. This fact indicates the presence in these fractions of proteins that regulate endothelial proliferation. In this case, the predominant increase in proliferation of the target cells was observed in the presence of fractions 1-4, 6, and 9-12. Moreover, the most significant effect in a wide range of concentrations was exerted by fraction 1 (high and low concentrations; dose-dependent effect), as well as fractions 3 and 4 (all concentrations except 10%), while the other fractions only exerted their influence in several dilutions. The inhibitory effect on endothelial cell proliferation was exerted by fraction 8 (high concentrations; dose-dependent effect) and fraction 11 (low concentrations). The rest of the fractions (5 and 7) did not change proliferation of the target cells.

The data obtained by us are consistent with both the literature data on the multidirectional effect of

NK cells on angiogenesis in *in vitro* systems [12] and our previously obtained data regarding MVs produced by NK-92 cells [29].

When assessing the effect of the protein fractions of the MV lysate on endothelial cell migration, multidirectional effects were also found. For example, fractions 1, 3, 5, 9, and 11 increased the number of cells that migrated into the zone of the disturbed monolayer, which may imply the production by NK cells and the subsequent transfer by means of MVs of a variety of cytokines that can affect the formation of blood vessels [4]. Despite this, in other cases, i.e. during cultivation of ECs in the presence of fractions 2, 4, 6, and 12, decreased migration of the target cells was observed, which can be accounted for by increased dying of ECs in the presence of specific proteins from the MV cargo, including antiangiogenic factors. At the same time, the predominant suppression of migration of the target cells was observed in the presence of fraction 6 (all concentrations except 0.039%) and fraction 12 (high and low concentrations). Cultivation of ECs in the presence of fraction 10 revealed opposite effects depending on dilution: for example, at a high concentration (10%), the fraction dose-dependently decreased the number of cells in the zone of the disturbed monolayer, and in a low concentration (0.313%), on the contrary, it increased this parameter. The observed multidirectional effect of this fraction indicates different limiting concentrations of factors that stimulate or inhibit migration of the target cells, at the cumulative achievement of which the influence of some inducer proteins begins to dominate, while the effective action of the others is gradually leveled out. The rest of the fractions (7 and 8) did not affect endothelial cell migration.

It was also found that cultivation of ECs in the presence of fractions 6-9 increased the residual area in the zone of the disturbed monolayer, with the number of the migrated target cells elevated or not changed significantly. In the case of fraction 4, the residual area did not change with a simultaneous decrease in the number of the cells, and in the case of fraction 10, this parameter lowered with a simultaneous decrease in the number of the target cells. The data obtained, which not in all studied cases reflect the negative correlation between migration and the filling area, may indicate changes in the morphology of ECs under the influence of both pro-angiogenic and anti-angiogenic factors contained in the inducers. At the same time, low endothelial cell migration and proliferation decreased by some factors propagated by NK cells by means of their MVs can, *in vivo*, contribute to the disintegration of the vascular endothelial lining. This, in turn, leads to a disruption of blood vessel permeability and

can contribute to other pathologies associated with endothelial dysfunction [32].

The multidirectional dose-dependent effects of different concentrations of the NK-92 cell derived MV lysate fractions in relation to the regulation of endothelial proliferation and migration indicate the presence of cytokines in MVs that control these processes. Such cytokines in the MV cargo may be cytokines with opposite effects: VEGF [20], a stimulator of angiogenesis, as well as IL-10 [10] and TGF- β [21], inhibitors of angiogenesis. Previously, we have obtained data that NK cells upon contact cultivation with ECs lengthen capillary-like structures formed by ECs [30]. NK-92 cells are a source of VEGF and carry the VEGFR1 receptor on their surface [27]. VEGF is one of the main and most important factors that regulate all stages of angiogenesis, stimulating endothelial cell migration, proliferation and viability [1]. Moreover, NK-92 cells are a source of the matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 [13], which play an important role in angiogenesis [5]. Matrix metalloproteinases provide degradation and remodeling of the extracellular matrix [34] and stimulate endothelial cell migration [8]. There is evidence in the literature that, due to their proteolytic activity, matrix metalloproteinases play an important role in the regulation of signaling pathways that control cell proliferation, invasion, and viability [5].

Previously, using the MALDI-TOF mass spectrometry method, we have found 986 proteins in MVs produced by NK-92 cells, including semaphorins,

TGF- β , RANTES, IP-10, CXCL11, etc. (Table 3) [23], which also indicates the active influence of NK cells on angiogenesis and the functions of ECs. Table 3 includes the cytokine receptors found in MVs, which could competitively bind to cytokines, reducing their autocrine effect on ECs.

Comparison of data on the effect of the protein fractions of the NK-92 cell derived MV lysate on proliferation and migration of EA.Hy926 cells also revealed a heterogeneous relationship. It is logical to assume that when cells proliferate, the migration stops. However, such an effect was observed only in a part of the obtained fractions: when fractions 2, 4, 10, and 12 were added, the number of proliferating cells increased but the number of migrated cells decreased. At the same time, when fractions 1, 3, 6, and 9-11 were added, the number of proliferating and migrated cells increased simultaneously. Fraction 5 did not change proliferation, but it increased migration, while fraction 8, on the contrary, decreased proliferation and did not change endothelial cell migration. Fraction 7 did not affect the numbers of migrated and proliferated cells.

Proliferation and the migration rates have different effects on the vasculature, as they can be weakened in different ways by selective agents in proliferative diseases such as cancer; or these parameters can be selectively increased in ischemic diseases, wound healing or regenerative medicine. Using computer modeling, it was shown that proliferation is of great importance in the development of the tumor

TABLE 3. FUNCTIONS OF SEVERAL PROTEINS OF MICROVESICLES PRODUCED BY NK-92 CELLS AND THEIR PRESUMPTIVE DISTRIBUTION IN THE OBTAINED PROTEIN FRACTIONS

Protein	MW, kDa	Function / Biological process	Protein fractions
C-C chemokine receptor type 3	7.8	CCL5, CCL7, CCL11, CCL13, CCL15, CCL24, CCL26, and CCL28 receptor	8, 9, 10, 11,12
Prostaglandin E2 receptor EP4 subtype (EP4)	53.1	PGE2 receptor, inhibition of cell cytotoxicity	3, 4, 5
C-C motif chemokine 5 (CCL5, RANTES)	10.0	chemokine, inflammatory mediator	8, 9, 10, 11,12
C-X-C motif chemokine 10 (CXCL10, IP-10)	10.9	chemokine, inflammatory mediator control of cell migration	8, 9, 10, 11,12
C-X-C motif chemokine 11 (CXCL11)	10.4	chemokine, inflammatory mediator, control of cell migration	8, 9, 10, 11,12
Interferon β	22.3	cell activation	5
Semaphorin-4D (SEMA4D, CD100), isoform 1	96.1	activated cell surface receptor, mediating of cell cytotoxicity by binding to CD72 on the target cell	4, 5
Transforming growth factor β-1	44.3	control of cell activity, regulation of differentiation	3, 4, 5

vasculature [33]. When proliferation is low, the vessels reach the tumor inner space, but the capillaries still do not cover most of the area. Thus, cell migration allows the vasculature to spread in the tumor space, but with fewer cells. When proliferation is moderate, the tumor vasculature spreads throughout the area. In this case, there is a balance between proliferation and migration, in which proliferation is too low to allow the proliferation of end cells, but it is high enough for vessels to grow. This leads to an expansion of the tumor space due to cell migration and better coverage due to the branching of new cells. When proliferation is high, the resulting vasculature is minimal but very tortuous [33]. The heterogeneous effect of the protein fractions of the NK-92 cell derived MV lysate on proliferation and migration of EA.Hy926 cells found by us confirms the multifunctional role of NK cells in controlling the development of the vascular network in health and disease.

In this study, we also analyzed the effect of the protein fractions of the NK-92 cell derived MV lysate on the expression of the CD54 (ICAM-1), CD34, CD31 (PECAM-1) and CD119 (IFN γ R1) receptors by EA.Hy926 cells. The choice of the receptors for assessing their expression by the target cells was due to the fact that previously, it was found by us that the expression of these receptors changed after cultivation of ECs in the presence of MVs produced by NK-92 cells [29]. Namely, incubation of ECs in the presence of MVs decreased the number of the cells expressing the CD34, CD31 and CD119 receptors. A decrease in the number of the target cells with the CD34⁺ phenotype after incubation with MVs produced by NK-92 cells was accompanied by an increased expression of this receptor by ECs as compared to intact cells. Despite no differences in the number of ECs with the CD54⁺ phenotype, the intensity of CD54 expression on ECs was higher after their incubation with MVs compared to intact cells [29].

We found that proteins of the NK-92 cell derived MV lysate fractions did not alter the expression of the CD54, CD34, CD31 and CD119 receptors. No changes in the expression indicate an insufficient concentration of proteins capable of influencing the relevant gene expression and the probable presence of active phosphorylated forms of signal proteins in the lysate (one cannot exclude a possible contribution to

the observed effects of miRNAs and membrane bound proteins). Besides, it may indicate no contamination of the protein fractions with lipopolysaccharides after their being filtered for the purpose of sterilization (this necessary procedure also lowers the concentration of active components of the fractions).

Taking into account all the information presented, one can conclude that the our data obtained on altered proliferation and migration of EA.hy926 cells under the influence of the protein fractions of the NK-92 cell derived MV lysate and on insignificant contribution of the several inducers to the total lysate effect confirm the involvement of a variety of pro- and anti-angiogenic factors of leukocyte origin and associated signaling pathways in blood vessel formation [38].

Thus, MVs produced by NK-92 cells, in addition to cytotoxic proteins, carry other protein components (regulators of the immune response, inflammation, and angiogenesis) that can provide communication of NK cells with ECs, causing their activation and changing their proliferative and migratory activity in different directions. Comparison of the obtained data with the results of previous studies allows for proposing specific proteins that may be involved in these processes: calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II, serine/threonine kinase Akt, sphingosine-1-phosphate lyase 1, α -catulin, CXC chemokines, profilin-3, relaxin-3, etc. However, to elucidate the immunological and biochemical mechanisms underlying proliferation and migration of ECs, further research is needed to identify effector proteins in the cargo of MVs produced by NK cells and to search for direct evidence of their relation to the effects observed during an interaction of the MVs with ECs.

Conclusion

NK cells can perform their functions with the help of MVs, a new poorly studied object of cell communication. Further study of the role and the protein cargo of MVs produced by NK cells will expand the existing knowledge of the mechanisms of participation of these cells not only in the implementation of cytotoxic effects, but also in the regulation of various physiological processes, in particular angiogenesis.

References

1. Abhinand C.S., Raju R., Soumya S.J., Arya P.S., Sudhakaran P.R. VEGF-A/VEGFR2 signaling network in endothelial cells relevant to angiogenesis. *J. Cell Commun. Signal.*, 2016, Vol. 10, no. 4, pp. 347-354.
2. Amchislavskii E.I., Sokolov D.I., Sel'kov S.A., Freidlin I.S. Proliferative activity of human endothelial cell line EA.hy926 and its modulation. *Tsitologiya*, 2005, Vol. 47, no. 5, pp. 393-403. (In Russ.)

3. Ashton S.V., Whitley G.S., Dash P.R., Wareing M., Crocker I.P., Baker P.N., Cartwright J.E. Uterine spiral artery remodeling involves endothelial apoptosis induced by extravillous trophoblasts through Fas/FasL interactions. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2005, Vol. 25, no. 1, pp. 102-108.
4. Bassani B., Baci D., Gallazzi M., Poggi A., Bruno A., Mortara L. Natural killer cells as key players of tumor progression and angiogenesis: old and novel tools to divert their pro-tumor activities into potent anti-tumor effects. *Cancers*, 2019, Vol. 11, no. 4, 461. doi: 10.3390/cancers11040461.
5. Bauvois B. New facets of matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 as cell surface transducers: outside-in signaling and relationship to tumor progression. *Biochim. Biophys. Acta*, 2012, Vol. 1825, no. 1, pp. 29-36.
6. Blois S.M., Klapp B.F., Barrientos G. Decidualization and angiogenesis in early pregnancy: unravelling the functions of DC and NK cells. *J. Reprod. Immunol.*, 2011, Vol. 88, no. 2, pp. 86-92.
7. Burger D., Schock S., Thompson C.S., Montezano A.C., Hakim A.M., Touyz R.M. Microparticles: biomarkers and beyond. *Clin. Sci. (Lond.)*, 2013, Vol. 124, no. 7, pp. 423-441.
8. Carmeliet P., Jain R.K. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature*, 2011, Vol. 473, no. 7347, pp. 298-307.
9. Chazara O., Xiong S., Moffett A. Maternal KIR and fetal HLA-C: a fine balance. *J. Leukoc. Biol.*, 2011, Vol. 90, no. 4, pp. 703-716.
10. Clark S.E., Burrack K.S., Jameson S.C., Hamilton S.E., Lenz L.L. NK cell IL-10 production requires IL-15 and IL-10 driven STAT3 activation. *Front. Immunol.*, 2019, Vol. 10, 2087. doi: 10.3389/fimmu.2019.02087.
11. Dasgupta S.K., Abdel-Monem H., Niravath P., Le A., Bellera R.V., Langlois K., Nagata S., Rumbaut R.E., Thiagarajan P. Lactadherin and clearance of platelet-derived microvesicles. *Blood*, 2009, Vol. 113, no. 6, pp. 1332-1339.
12. Dondero A., Casu B., Bellora F., Vacca A., de Luisi A., Frassanito M.A., Cantoni C., Gaggero S., Olive D., Moretta A., Bottino C., Castriconi R. NK cells and multiple myeloma-associated endothelial cells: molecular interactions and influence of IL-27. *Oncotarget*, 2017, Vol. 8, no. 21, pp. 35088-35102.
13. Edsparr K., Johansson B.R., Goldfarb R.H., Basse P.H., Nannmark U., Speetjens F.M., Kuppen P.J., Lennernas B., Albertsson P. Human NK cell lines migrate differentially *in vitro* related to matrix interaction and MMP expression. *Immunol. Cell Biol.*, 2009, Vol. 87, no. 6, pp. 489-495.
14. el Costa H., Tabiasco J., Berrebi A., Parant O., Aguerre-Girr M., Piccinni M.P., Le Bouteiller P. Effector functions of human decidual NK cells in healthy early pregnancy are dependent on the specific engagement of natural cytotoxicity receptors. *J. Reprod. Immunol.*, 2009, Vol. 82, no. 2, pp. 142-147.
15. Fraser R., Whitley G.S., Thilaganathan B., Cartwright J.E. Decidual natural killer cells regulate vessel stability: implications for impaired spiral artery remodelling. *J. Reprod. Immunol.*, 2015, Vol. 110, pp. 54-60.
16. Gong J.H., Maki G., Klingemann H.G. Characterization of a human cell line (NK-92) with phenotypical and functional characteristics of activated natural killer cells. *Leukemia*, 1994, Vol. 8, no. 4, pp. 652-658.
17. Halim A.T., Ariffin N.A., Azlan M. Review: the multiple roles of monocytic microparticles. *Inflammation*, 2016, Vol. 39, no. 4, pp. 1277-1284.
18. Hanna J., Goldman-Wohl D., Hamani Y., Avraham I., Greenfield C., Natanson-Yaron S., Prus D., Cohen-Daniel L., Arnon T.I., Manaster I., Gazit R., Yutkin V., Benharroch D., Porgador A., Keshet E., Yagel S., Mandelboim O. Decidual NK cells regulate key developmental processes at the human fetal-maternal interface. *Nat. Med.*, 2006, Vol. 12, no. 9, pp. 1065-1074.
19. Hanna J., Wald O., Goldman-Wohl D., Prus D., Markel G., Gazit R., Katz G., Haimov-Kochman R., Fujii N., Yagel S., Peled A., Mandelboim O. CXCL12 expression by invasive trophoblasts induces the specific migration of CD16 human natural killer cells. *Blood*, 2003, Vol. 102, no. 5, pp. 1569-1577.
20. Hawke L.G., Whitford M.K.M., Ormiston M.L. The production of pro-angiogenic VEGF-A isoforms by hypoxic human NK cells is independent of their TGF-beta-mediated conversion to an ILC1-like phenotype. *Front. Immunol.*, 2020, Vol. 11, 1903. doi: 10.3389/fimmu.2020.01903.
21. Jiang Y., Yang M., Sun X., Chen X., Ma M., Yin X., Qian S., Zhang Z., Fu Y., Liu J., Han X., Xu J., Shang H. IL-10(+) NK and TGF-beta(+) NK cells play negative regulatory roles in HIV infection. *BMC Infect. Dis.*, 2018, Vol. 18, 80. doi: 10.1186/s12879-018-2991-2.
22. Kalkunte S.S., Mselle T.F., Norris W.E., Wira C.R., Sentman C.L., Sharma S. Vascular endothelial growth factor C facilitates immune tolerance and endovascular activity of human uterine NK cells at the maternal-fetal interface. *J. Immunol.*, 2009, Vol. 182, no. 7, pp. 4085-4092.
23. Korenevsky A.V., Shcherbitskaia A.D., Berezkina M.E., Markova K.L., Alexandrova E.P., Balabas O.A., Selkov S.A., Sokolov D.I. MALDI-TOF mass spectrometric protein profiling of microvesicles produced by the NK-92 natural killer cell line. *Medical Immunology (Russia)*, 2020, Vol. 22, no. 4, pp. 633-646. doi: 10.15789/1563-0625-mms-1976.
24. Kowal J., Arras G., Colombo M., Jouve M., Morath J.P., Primdal-Bengtson B., Dingli F., Loew D., Tkach M., Thery C. Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 2016, Vol. 113, no. 8, pp. E968-E977.

25. Leonard S., Murrant C., Tayade C., van den Heuvel M., Watering R., Croy B.A. Mechanisms regulating immune cell contributions to spiral artery modification – facts and hypotheses – a review. *Placenta*, 2006, Vol. 27, Suppl., pp. 40-46.
26. Li P., Kaslan M., Lee S.H., Yao J., Gao Z. Progress in exosome isolation techniques. *Theranostics*, 2017, Vol. 7, no. 3, pp. 789-804.
27. Male V., Trundley A., Gardner L., Northfield J., Chang C., Apps R., Moffett A. Natural killer cells in human pregnancy. In: Campbell K. (eds) *Natural Killer Cell Protocols. Methods Mol. Biol.*, 2010, Vol. 612, pp. 447-463.
28. Markov A.S., Markova K.L., Sokolov D.I., Selkov S.A., MARKMIGRATION. Russia, 2019.
29. Markova K.L., Mikhailova V.A., Korenevsky A.V., Milyutina Y.P., Rodygina V.V., Aleksandrova E.P., Markov A.S., Balabas O.A., Selkov S.A., Sokolov D.I. Microvesicles produced by natural killer cells of the NK-92 cell line affect the phenotype and functions of endothelial cells of the EA.Hy926 cell line. *Medical Immunology (Russia)*, 2020, Vol. 22, no. 2, pp. 249-268. doi: 10.15789/1563-0625-MPB-1877.
30. Markova K.L., Stepanova O.I., Sheveleva A.R., Kostin N.A., Mikhailova V.A., Selkov S.A., Sokolov D.I. Natural killer cell effects upon angiogenesis under conditions of contact-dependent and distant co-culturing with endothelial and trophoblast cells. *Medical Immunology (Russia)*, 2019, Vol. 21, no. 3, pp. 427-440. doi: 10.15789/1563-0625-2019-3-427-440.
31. Mikhailova V.A., Ovchinnikova O.M., Zainulina M.S., Sokolov D.I., Sel'kov S.A. Detection of microparticles of leukocytic origin in the peripheral blood in normal pregnancy and preeclampsia. *Bull. Exp. Biol. Med.*, 2014, Vol. 157, no. 6, pp. 751-756.
32. Morris G., Puri B.K., Olive L., Carvalho A., Berk M., Walder K., Gustad L.T., Maes M. Endothelial dysfunction in neuroprogressive disorders-causes and suggested treatments. *BMC Med.*, 2020, Vol. 18, 305. doi: 10.1186/s12916-020-01749-w.
33. Norton K.A., Popel A.S. Effects of endothelial cell proliferation and migration rates in a computational model of sprouting angiogenesis. *Sci. Rep.*, 2016, Vol. 6, 36992. doi: 10.1038/srep36992.
34. Papetti M., Herman I.M. Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 2002, Vol. 282, no. 5, pp. 947-C970.
35. Sedgwick A.E., D'Souza-Schorey C. The biology of extracellular microvesicles. *Traffic*, 2018, Vol. 19, pp. 319-327.
36. Sokolov D.I., Ovchinnikova O.M., Korenkov D.A., Viknyanschuk A.N., Benken K.A., Onokhin K.V., Selkov S.A. Influence of peripheral blood microparticles of pregnant women with preeclampsia on the phenotype of monocytes. *Transl. Res.*, 2016, Vol. 170, pp. 112-123.
37. Thornhill M.H., Li J., Haskard D.O. Leucocyte endothelial cell adhesion: a study comparing human umbilical vein endothelial cells and the endothelial cell line EA-hy-926. *Scand. J. Immunol.*, 1993, Vol. 38, no. 3, pp. 279-286.
38. Yao L., Sgadari C., Furuke K., Bloom E.T., Teruya-Feldstein J., Tosato G. Contribution of natural killer cells to inhibition of angiogenesis by interleukin-12. *Blood*, 1999, Vol. 93, no. 5, pp. 1612-1621.

Авторы:

Корневский А.В. — д.б.н., ведущий научный сотрудник группы протеомной иммунорегуляции отдела иммунологии и межклеточных взаимодействий ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта», Санкт-Петербург, Россия

Березкина М.Э. — лаборант-исследователь лаборатории межклеточных взаимодействий отдела иммунологии и межклеточных взаимодействий ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта», Санкт-Петербург, Россия

Герп Т.Н. — лаборант лаборатории межклеточных взаимодействий отдела иммунологии и межклеточных взаимодействий ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта», Санкт-Петербург, Россия

Authors:

Korenevsky A.V., PhD, MD (Biology), Leading Research Associate, Proteomic Immunoregulation Group, Department of Immunology and Cell Interactions, D. Ott Institute of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Berezkina M.E., Research Assistant, Laboratory of Cell Interactions, Department of Immunology and Cell Interactions, D. Ott Institute of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Gert T.N., Assistant, Laboratory of Cell Interactions, Department of Immunology and Cell Interactions, D. Ott Institute of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Синявин С.А. — студент группы протеомной иммунорегуляции отдела иммунологии и межклеточных взаимодействий ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта», 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»; профессор кафедры иммунологии ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Соколов Д.И. — д.б.н., доцент, заведующий лабораторией межклеточных взаимодействий отдела иммунологии и межклеточных взаимодействий ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта»; профессор кафедры иммунологии ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Sinyavin S.A., Student, Proteomic Immunoregulation Group, Department of Immunology and Cell Interactions, D. Ott Institute of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Selkov S.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Honored Researcher of Russia, Head, Department of Immunology and Cell Interactions, D. Ott Institute of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Medicine; Professor, Department of Immunology, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Sokolov D.I., PhD, MD (Biology), Assistant Professor, Head, Laboratory of Cell Interactions, Department of Immunology and Cell Interactions, D. Ott Institute of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Medicine; Professor, Department of Immunology, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Поступила 02.07.2021
Принята к печати 07.11.2021

Received 02.07.2021
Accepted 07.11.2021

ОПЫТ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ НК-КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА С ФИДЕРНЫМИ КЛЕТКАМИ *IN VITRO*

Гельм Ю.В.¹, Пасова И.А.¹, Гривцова Л.Ю.¹, Константинова Т.В.¹,
Михайловский Н.В.², Рыбачук В.А.^{2,3}, Абакушина Е.В.²,
Иванов С.А.^{1,4}, Каприн А.Д.^{4,5}

¹ Медицинский радиологический научный центр имени А.Ф. Цыба — филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения РФ, г. Обнинск, Калужская обл., Россия

² ООО «Текон Медицинские приборы», Москва, Россия

³ ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Москва, Россия

⁴ ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», Москва, Россия

⁵ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения РФ, г. Обнинск, Калужская обл., Россия

Резюме. Адоптивная иммунотерапия с использованием НК-клеток стала многообещающим терапевтическим направлением. НК-клетки являются компонентом врожденной иммунной системы, действуют как ключевые регуляторы и обладают выраженной противоопухолевой цитолитической активностью. Для того чтобы стало возможным оценить терапевтический эффект адоптивной НК-клеточной иммунотерапии на доклинических этапах существует потребность в надежных протоколах для получения НК-клеток *in vitro*. Существует большое количество публикаций о способах активации и генерации НК-клеток человека, в том числе с использованием фидерных клеток и различных цитокинов.

В статье описан опыт совместного культивирования НК-клеток от онкологических больных или доноров с фидерными клетками и без них (контрольная группа). В качестве фидера использовали клеточную линию K562 после облучения двух видов: после генной модификации K562 (гмK562) мембраносвязанными mbIL15, mbIL21 и без нее. НК-клетки смешивали с фидером в соотношении 1:1, 1:2 и 1:5 на 0-й, 7-й и 14-й день соответственно. Ежедневная морфологическая оценка показала, что после 3 суток культивирования НК-клетки как доноров, так и онкологических больных начинали пролиферировать и увеличиваться в размерах, а жизнеспособность фидерных клеток начинала снижаться, и к окончанию сроков культивирования составляла менее 20%. В контрольной группе без фидера после 3-го дня культивирования НК-клетки доноров и онкологических больных уходили в апоптоз, уровень их жизнеспособности снижался до 70%.

Адрес для переписки:

Гельм Юлия Витальевна
Медицинский радиологический научный центр
имени А.Ф. Цыба
249036, Россия, Калужская область, г. Обнинск,
ул. Королева, 4.
Тел.: 8 (48439) 2-96-04.
E-mail: julia_marizina@mail.ru

Address for correspondence:

Gelm Yulia V.
A. Tsyb Medical Radiological Research Center
249036, Russian Federation, Kaluga Region, Obninsk,
Korolev str., 4.
Phone: 7 (48439) 2-96-04.
E-mail: julia_marizina@mail.ru

Образец цитирования:

Ю.В. Гельм, И.А. Пасова, Л.Ю. Гривцова,
Т.В. Константинова, Н.В. Михайловский,
В.А. Рыбачук, Е.В. Абакушина, С.А. Иванов,
А.Д. Каприн «Опыт культивирования НК-клеток
человека с фидерными клетками *in vitro*» //
Медицинская иммунология, 2022. Т. 24, № 3. С. 481-490.
doi: 10.15789/1563-0625-IVE-2481

© Гельм Ю.В. и соавт., 2022

For citation:

Yu.V. Gelm, I.A. Pasova, L.Yu. Grivtsova, T.V. Konstantinova,
N.V. Mikhaylovsky, V.A. Rybachuk, E.V. Abakushina,
S.A. Ivanov, A.D. Kaprin "In vitro experience of human
natural killer cell culture with feeder cells", Medical
Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2022,
Vol. 24, no. 3, pp. 481-490.
doi: 10.15789/1563-0625-IVE-2481

DOI: 10.15789/1563-0625-IVE-2481

Проведена сравнительная оценка двух разных способов получения НК-клеток человека. Показано, что при выделении НК-клеток после магнитной селекции доля CD3⁺CD56⁺CD16⁺ клеток составляла более 90%, а после удаления адгезивных клеток — не менее 60%. При культивировании НК-клеток онкологических больных после магнитной селекции совместно с гмK562 на 21-е сутки количество НК-клеток увеличивалось в 85 раз. При культивировании НК-клеток доноров совместно с обычными K562 на 21-е сутки количество НК-клеток увеличивалось только до 8 раз. Показано, что в супернатантах, собранных в процессе культивирования НК-клеток с фидерными клетками двух видов, многократно увеличивались концентрации TNF α и IFN γ относительно контрольной группы. Экспериментальным путем подобраны оптимальные условия генерации НК-клеток.

Ключевые слова: НК-клетки, мононуклеарные клетки, фидерные клетки, культивирование, пролиферация, ИФА, фенотип

IN VITRO EXPERIENCE OF HUMAN NATURAL KILLER CELL CULTURE WITH FEEDER CELLS

Gelm Yu.V.^a, Pasova I.A.^a, Grivtsova L.Yu.^a, Konstantinova T.V.^a,
Mikhaylovsky N.V.^b, Rybachuk V.A.^{b,c}, Abakushina E.V.^b,
Ivanov S.A.^{a,d}, Kaprin A.D.^{d,e}

^a A. Tsyb Medical Radiological Research Center, Affiliation of the National Medical Research Center of Radiology, Obninsk, Kaluga Region, Russian Federation

^b Tekon Medical Devices LLC, Moscow, Russian Federation

^c Lomonosov State University, Moscow, Russian Federation

^d Russian University of the People's Friendship, Moscow, Russian Federation

^e National Medical Research Center of Radiology, Obninsk, Kaluga Region, Russian Federation

Abstract. Adoptive immunotherapy using NK cells has become a promising therapeutic area. NK cells are a component of the innate immune system, act as key regulators, and have potent antitumor cytolytic activity. In order to be able to evaluate the therapeutic effect of adoptive NK cell immunotherapy at preclinical stages, there is a need for reliable protocols for *in vitro* production of NK cells. There are a large number of publications on methods for activating and generating human NK cells, including using feeder-cells and various cytokines.

The article describes the experience of cultivation of NK cells from cancer patients or donors with feeder-cells and without feeder-cells (control group). The K562 cell line was used as a feeder after irradiation of two types: after gene modification of K562 (gmK562) with membrane-bound mbIL15, mbIL21 and without it. NK cells donors and cancer patients were mixed with K562 in a ratio of 1:1, 1:2 and 1:5 on 0, 7 and 14 days respectively. Daily morphological assessment showed that, NK cells donors and cancer patients began to proliferate and increase in size, while the viability of feeder cells began to decrease after 3 days of cultivation, and they were less than 20% on 21 days. NK cells of donors and cancer patients went into apoptosis, their viability level decreased to 70% in the control group (without feeder-cells) after 3 days of cultivation.

A comparative evaluation of two different methods of obtaining human NK cells was carried out. It was shown when NK cells were isolated by magnetic selection, the proportion of CD3⁺CD56⁺CD16⁺ cells were more than 90%, and after the removal of adherent cells, it was at least 60%. When cultivating NK cells cancer patients (after magnetic separation) together with gmK562 on the 21st day, it was possible to increase the number of NK cells up to 85 times. When cultivating NK cells donors (after adhesion) together with non-genetically modified K562 cells on 21 days, it was possible to increase the number of NK cells up to 8 times. It was shown that in the supernatants collected during the cultivation of NK cells with feeder cells (both irradiated with K562 and genetically modified with K562), the concentrations of TNF α and IFN γ increased many times relative to the control group. The optimal conditions for culturing NK cells were experimentally selected to obtain a large number of NK cells.

Keywords: NK cells, mononuclear cells, feeder cells, culture, proliferation, ELISA, phenotype

Введение

Основываясь на уникальных свойствах клеток естественных киллеров (НК-клеток), их применение в клинической практике может иметь важное терапевтическое значение при лечении рака [4, 5, 6, 11, 13]. Способность НК-клеток естественным способом лизировать опухолевые клетки без предварительной сенсibilизации и обеспечивает их основную роль в иммунном надзоре против злокачественных клеток. Из-за ограниченного клинического использования и токсичности химиотерапии дополнительной опцией для увеличения показателей выживаемости онкологических больных может служить адаптивная иммунотерапия (АИТ) (от англ. adopt – переносить, усыновлять) с применением цитотоксических лимфоцитов и НК-клеток [7, 8]. АИТ позволяет использовать иммунную систему организма больного для того, чтобы уничтожить раковые клетки. Хотя недавно был достигнут некоторый прогресс в терапии дендритными клетками и цитотоксическими Т-лимфоцитами (CTLs), их клиническое применение ограничено необходимостью распознавания опухолевого антигена. Однако большинство антигенов, экспрессируемых опухолевыми клетками, идентичны генным продуктам нормальных клеток. В противоположность этому НК-клетки имеют антиген-независимую цитотоксическую активность против трансформированных клеток [5, 6, 9]. АИТ на основе НК-клеток, противоопухолевый потенциал которых усиливают с помощью культивирования *in vitro* в присутствии цитокинов и фидерных клеток (от англ. feeder cells – клетки кормилицы) проводится в некоторых странах, например, в США, Италии, Испании, Китае, Таиланде, Сингапуре и Бразилии, что указывает на повышенный интерес к данной проблеме [12, 14, 15]. Однако в Российской Федерации на сегодняшний день нет доступных исследований, посвященных длительной активации и генерации НК-клеток. Чтобы изучить потенциал цитокинов при культивировании НК-клеток, обычно используют фидерные клетки на основе K562, экспрессирующие мембран связанные химерные рецепторы IL-21 (mbIL21) и IL-15 (mbIL15), и исследуют экспансию и фенотип НК-клеток, функциональную активность в ответ на периодическую стимуляцию фидерными клетками [16]. Генерация НК-клеток в этих условиях и многократное увеличение их количества обеспечивается при длительном культивировании не менее 21 дня [15].

Для адаптивной иммунотерапии рака используются различные источники НК-клеток. Цито-

токсические НК-лимфоциты можно получить из периферических мононуклеарных клеток или из CD34⁺ гемопоэтических стволовых клеток, индуцированных плюрипотентных клеток или из стволовых клеток пуповинной крови, однако это требует длительного периода культивирования более 21 дня, что не всегда выполнимо для лечения больных высокого риска [15]. Поэтому некоторые группы исследователей для терапии используют НК-клеточные линии (NK-92, NKL, KYNG-1, YT, NKG). Их можно модифицировать генами различных цитокинов или химерными антигенными рецепторами. Для культивирования НК-клеток обычно используют такие цитокины как IL-2, IL-15, IL-18 и IL-21 и генетически модифицированные фидерные клетки [15]. Общая γ -цепь рецепторов цитокинов IL-2, IL-15 и IL-21 была изучена в отношении активации, созревания и пролиферации НК-клеток. Известно, что IL-15 играет роль в активации и жизнеспособности НК-клеток, что обосновывает его применение для получения фидерных клеток, экспрессирующих IL-15. Разрешенным методом для получения субпопуляции НК-клеток по требованиям GMP является лейкофрез и редукция Т- и В-лимфоцитов [14].

Однако существует проблема сопоставления различных протоколов экспансии НК-клеток, т.к. продолжительность культивирования НК-клеток *ex vivo* колеблется от нескольких часов (при быстрой активации) до нескольких недель (при долгосрочном культивировании). Используются многочисленные исходные компоненты сред с различной долей НК-клеток, комбинации нескольких цитокинов в разных концентрациях. Изучаются методы культивирования НК-клеток с фидерными клетками или без них. Следовательно, существует значительный интерес к разработке методов генерации НК-клеток *ex vivo*.

Изучение динамики экспрессии цитокинов, а также цитокинопродуцирующего потенциала иммунокомпетентных клеток позволяет дополнить изучение их функциональных характеристик. TNF α образуется НК-клетками, воздействует на опухолевые клетки в условиях *in vivo* за счет запуска апоптоза, генерации активных форм кислорода и окиси азота, участвует в развитии иммунного ответа, обуславливая пролиферацию, и препятствует возникновению иммунологической толерантности. IFN γ обладает непосредственной тумороцидной и противовирусной активностью, стимулирует активность НК-клеток и пролиферацию. Уровень цитокинов может быть использован в качестве маркера для оценки степени активации и пролиферации НК-клеток.

Авторы имеют многолетний опыт работы в области культивирования лимфоцитов человека. Ранее показано, что использование комбинации IL-2, IL-15 и IL-12 в низких концентрациях способствует получению цитокин-активированных киллеров за 10-14 дней с высокой жизнеспособностью (> 95%), пролиферативной и цитотоксической активностью [1, 2]. Имеется опыт применения цитокин-активированных киллеров для АИТ онкологических больных с 2013 года, была доказана безопасность и отсутствие токсичности у данного способа лечения [3, 10]. Показано, что применение АИТ у некоторых пациентов позволяет увеличить продолжительность безрецидивного периода, уменьшить количество побочных эффектов химиотерапии и улучшить результаты комплексного лечения [3, 10].

Целью данной работы являлось изучение способов экспансии *in vitro* NK-клеток онкологических больных и доноров в сочетании с фидерными клетками с оценкой жизнеспособности, морфологии и цитокинопродукции NK-клеток на этапах длительного культивирования в течение 21 суток.

Материалы и методы

Объект исследования — периферическая кровь онкологических больных и доноров. Из гепаринизированной венозной крови на градиенте плотности фиколла ($\rho = 1,077$) были выделены мононуклеары (МНК), далее дважды отмывали фосфатно-солевым буфером ($\text{pH} = 7,4$) и доводили до нужной концентрации. Для оценки морфологии культивируемых клеток с помощью инвертированного микроскопа (Nikon, Eclipse TS100, Япония) проводили визуальный анализ изменения формы, размеров, гранулярности и наличия адгезивных свойств у изучаемых клеток (МНК, моноциты, NK, K562, гмK562). Жизнеспособность культивируемых клеток определяли методом подсчета в камере Горяева с помощью 0,4% раствора трипанового синего («Биолот», Россия), пересчитывали в процентном соотношении долю окрашенных (мертвых) к общему количеству клеток. Индекс пролиферации (ИП) клеток определяли по формуле:

$$\text{ИП} = X_{n+1} / X_n,$$

X_n — исходное число клеток для каждой группы, X_{n+1} — конечное число выращенных для каждой группы клеток. Подсчет K562 проводили при каждой пересадке в течение всего срока культивирования и перед облучением. Оценку пролиферации фидерных клеток K562 проводили на 1-е, 3-и и 7-е сутки культивирования после облучения. Подсчет NK-клеток проводили после

выделения, затем оценку пролиферации проводили на 7-е, 14-е и 21-е сутки культивирования с фидерными клетками.

Выделение NK-клеток

Выделение NK-клеток проводили с помощью набора NK Cell Isolation Kit Human (Miltenyi Biotec, США) на магнитах по инструкции производителя (метод магнитной селекции). Либо методом адгезии моноцитов: полученные МНК доводили до концентрации 5 млн/мл, засеивали в культуральный флакон в чистой среде RPMI и инкубировали 60-90 минут, после чего собирали суспензионные клетки, центрифугировали 1000 об/мин в течение 5 минут и доводили до нужной концентрации.

Проточная цитометрия

Фенотипирование флуоресцентно меченых клеток проводили на цитофлуориметре FACScanto II (Becton Dickinson, США). Оценивали субпопуляционный состав Т-, NK-клеток, маркер активации HLA-DR и маркер апоптоза CD95 на лимфоцитах. Субпопуляционный состав клеточной суспензии после культивирования NK-клеток с фидером, определяли на 7-е, 14-е и 21-е сутки.

Для оценки чистоты выделения NK-клеток из МНК, сразу после магнитной селекции или метода удаления адгезивных клеток проводили цитофлуориметрический анализ в гейтах CD45^+ (лимфоциты), CD14^+ (моноциты). Для фенотипирования лимфоциты отмывали фосфатно-солевым буферным раствором (ФСБ) и окрашивали конъюгированными с PE или FITC антителами, которые связываются с антигенами клеточной поверхности, к CD3, CD4, CD14, CD16, HLA-DR, CD45, CD56, CD95 (Beckman Coulter и Becton Dickinson, США) по инструкции. Обработку полученных результатов проводили с помощью программы BD FACS Diva 6-0. Для подсчета доли апоптотических и мертвых клеток применяли также метод проточной цитометрии, основанный на двойном флуоресцентном окрашивании клеток аннексином V-AF488 (зеленая флуоресценция) — для оценки доли апоптотических клеток и пропидия иодидом (PI) (красная флуоресценция мертвых клеток). Окрашивание и инкубацию клеток с красителями, проводили по инструкции производителя.

Облучение K562

Фидерные клетки получали из клеточной линии K562, предварительно культивированные в течение 2 недель в условиях CO_2 -инкубатора (37°C , 5% CO_2). Облучение клеток проводили на установке Philips SL-20, энергия пучка 6 МэВ. Для эксперимента клетки K562 переносили в три

флакона и делили на три группы: первая — контроль (К), вторая — фракционированный способ облучения (два раза по 50 Гр с перерывом в 20 минут), третья — однократно в дозе 100 Гр в течение 25 минут. После облучения клетки K562 продолжали культивировать в течение 7 суток.

Фидерные клетки

В качестве фидерных клеток применялись клетки двух видов:

1) клетки постоянной клеточной линии миелобластного лейкоза K562, после культивирования и облучения электронами.

2) генно-модифицированные клетки K562 (гмK562), несущие на своей поверхности мембрано-связанные IL-15, IL-21 (mbIL15 и mbIL21) после облучения и криоконсервации и оттаивания, являющиеся разработкой и предоставленные ООО «СайСторЛаб».

В эксперимент были включены данные культивирования НК-клеток, полученных от 4 доноров, которые культивировали с K562 и 2 онкологических больных, которые культивировали с гмK562. Для контроля проводили культивирование НК-клеток доноров и больных без добавления фидера.

Облучение клеток K562 проводили электронами двумя разными способами: однократно в дозе 100 Гр и фракционированно дважды по 50 Гр.

Культивирование НК-клеток с фидером

Культивирование выделенных НК-клеток в концентрации 1 млн/мл совместно с фидерными клетками проводили до 21-х суток в условиях CO₂-инкубатора в питательной среде RPMI 1640 («ПанЭко», Россия) с IL-2 — 300 Ед/мл. Через каждые 48 часов обновляли питательную среду, добавляли IL-2 — 300 Ед/мл, ежедневно оценивали морфологию клеток. Фидерные клетки добавляли к НК-клеткам на 1-е, 7-е и 14-е сутки культивирования в соотношениях 1:1, 1:2 и 1:5 (НК:Фидер). В эти же дни отбирали часть клеток на фенотипирование, осаждали центрифугированием, собирали и замораживали супернатант для иммуноферментного анализа (ИФА). Для контроля проводили культивирование НК-клеток как после магнитной сепарации, так и после адгезии моноцитов в условиях CO₂-инкубатора в такой же питательной среде в концентрации 1 млн/мл без добавления фидера и собирали супернатант для ИФА.

Иммуноферментный анализ

В супернатантах, полученных на этапах совместного культивирования НК-клеток с фидерными клетками на 7-е, 14-е и 21-е сутки, для определения функциональной активности клеток, измеряли концентрации противоопухоле-

вых цитокинов (TNF α и IFN γ). ИФА проводили с помощью наборов реагентов «Вектор Бест» по инструкции фирмы производителя. Оптическую плотность образцов измеряли на фотометре ChroMate (Awareness Technology, США) в двухволновом режиме: основной фильтр — 450 нм, референс-фильтр — 620 нм.

Анализ результатов проводили с помощью программы Microsoft Excel 2007, данные представляли как среднее значение по группе или среднее $\pm$ стандартное отклонение.

Результаты и обсуждение

Облучение фидерных клеток K562

При культивировании клеток K562 уровень жизнеспособности достигал 99,7%. Перед облучением жизнеспособность K562 составляла $80,0 \pm 11,3\%$. Через сутки после однократного облучения K562 (в дозе 100 Гр), жизнеспособность снижалась до $64,8 \pm 14,8\%$, а при фракционированном (дважды по 50 Гр) — до $65,1 \pm 12,0\%$. На 3-и сутки после однократного облучения количество живых фидерных клеток снижалось до $59,6 \pm 19,5\%$, а при фракционированном — до $52,9 \pm 10,3\%$. На 7-е сутки после однократного облучения количество живых фидерных клеток снижалось до $41,8 \pm 20,9\%$; при фракционированном — до $46,1 \pm 13,9\%$. После однократного облучения дозой 100 Гр в течение следующих 7 суток культивирования фидерные клетки не пролиферировали. В группе с фракционированным облучением наблюдалась незначительная пролиферация клеток, относительно группы контроля.

Таким образом, изучено влияние ионизирующего излучения на пролиферативный потенциал клеток линии K562. Показано, что через 7 суток после облучения электронами однократно в дозе 100 Гр пролиферативный потенциал отсутствует, а жизнеспособность снижается за счет активации апоптоза в опухолевых клетках. Налажен способ получения фидерных клеток линии K562 для последующего культивирования с НК-клетками. Была выбрана доза облучения: 100 Гр однократно.

Экспансия НК-клеток

Метод проточной цитометрии показал, что после магнитной сепарации чистота выделения НК-клеток как доноров, так и онкологических больных (CD3⁺CD56⁺CD16⁺) составляла $90 \pm 2\%$, а после адгезии моноцитов — более $60 \pm 2\%$. Таким образом, метод магнитной селекции является наиболее эффективным. Второй способ, основанный на адгезии моноцитов, менее эффективен, но оказался приемлем для дальнейшего культивирования с фидерными клетками, а

также не требовал наличия специальных дорогостоящих наборов для выделения НК-клеток.

Морфологическая оценка НК-клеток в контрольной группе показала, что на 3-и сутки культивирования НК-клетки начинали увеличиваться в размерах и незначительно пролиферировать (20%), однако после 3 суток жизнеспособность клеток значительно снижалась, и уже на 7-е сутки составляла менее 70%, а к 14-м суткам — около 55%.

При совместном культивировании НК-клеток от онкологических больных или доноров с фидерными клетками ежедневные микроскопические наблюдения показали, что морфология НК-клеток также начинала меняться после 3 суток. Клетки увеличивались в размерах, становились гранулярными и пролиферировали в несколько раз, образуя полусферы, окружали фидерные клетки, которые в свою очередь постепенно распадалась на отдельные апоптотические тельца, ограниченные плазматической мембраной, и к 7-м суткам визуально их становилось значительно меньше (рис. 1, см. 2-ю стр. обложки). Оценив уровень пролиферации, можно отметить, что при культивировании НК-клеток гмK562 на 21-е сутки и их количество увеличивалось в 34,2-76,2 раза, а при использовании в качестве фидера обычных клеток K562 только в 4,1-8,4 раза.

Как известно, у доноров и онкологических больных процесс активации клеток *in vitro* не отличается, т.к. количество и качество НК-клеток зависит не от наличия опухоли, а от индивидуальных особенностей человека и его иммунной системы, что было нами подтверждено при изучении фенотипической характеристики и маркеров активации после совместного культивирования лимфоцитов с фидером. Из-за отсутствия существенных отличий результатов фенотипирования лимфоцитов доноров и онкологических больных, данные объединены в одну группу. В таблице 1 представлена фенотипическая характеристика лимфоцитов и маркеров активации после совместного культивирования с различными фидерными клетками: K562 и гмK562 по дням культивирования, перед добавлением новой порции фидерных клеток. Все данные представлены, как среднее значения $\pm$ стандартное отклонение. Для определения доли фидерных клеток при фенотипировании клеточной суспензии выделяли CD45 негативный гейт и вычисляли долю мертвых клеток. Процент мертвых НК-клеток выделяли среди CD16⁺CD56⁺CD3⁺ лимфоцитов.

Доля мертвых фидерных клеток (гмK562 и K562) увеличивалась к 21-м суткам культивирования в среднем более чем на 80%. После 7 суток

наблюдалось увеличение процентного содержания НК-клеток и снижение доли Т-лимфоцитов. Показано снижение среднего количества Т-лимфоцитов на 14-е сутки в 2 раза относительно 0 суток. Также через неделю культивирования отмечена экспрессия активационного маркера HLA-DR(all) на лимфоцитах.

Таким образом, показано, что при длительном культивировании лимфоцитов онкологических больных с генно-модифицированными фидерными клетками и доноров с обычными клетками линии K562, можно получить более 50% НК-клеток, при этом их цитотоксическая активность достигает 80%.

Иммуноферментный анализ

В контрольной группе, где НК-клетки доноров и онкологических больных культивировались без фидера, содержание TNF α и IFN γ в супернатантах на 7-е и 14-е сутки выявлено в следовых количествах. В таблице 2 представлены результаты иммуноферментного анализа супернатантов, собранных в процессе культивирования НК-клеток доноров и онкологических больных с различными фидерными клетками и без них. Все данные представлены, как среднее значения $\pm$ стандартное отклонение.

При культивировании НК-клеток как доноров так и онкологических больных с фидером, в супернатантах на 7-е и 14-е сутки многократно увеличивались концентрации TNF α и IFN γ , относительно контрольной группы без фидера, что указывает на активацию НК-клеток. Показано, что в образцах с гмK562 отмечается более высокая продукция TNF α и IFN γ , в отличие от образцов с обычными клетками линии K562. Вероятно, что такое резкое увеличение уровня цитокинов на ранних сроках культивирования в образцах с гмK562 и дает возможность НК-клеткам пролиферировать в большей степени. Постепенное снижение продукции обоих цитокинов НК-клетками к 21-м суткам наблюдалось при совместном культивировании с гмK562, так концентрация TNF α уменьшилась в 2,7 раз, а IFN γ в 2,1 раза, относительно 7-х суток. Обратная тенденция к увеличению продукции цитокинов наблюдалась в группе с обычными K562. Можно отметить повышение концентрации TNF α в 4 раза и IFN γ в 2,2 раза к окончанию сроков культивирования, относительно 7-х суток. Данное явление возможно связано с более поздней активацией НК-клеток, культивируемых с K562, по сравнению с гмK562.

Таким образом, можно заключить, что применение фидерных клеток в протоколах генерации НК-клеток, позволяет получить большое коли-

ТАБЛИЦА 1. РЕЗУЛЬТАТЫ ФЕНОТИПИРОВАНИЯ ИССЛЕДУЕМЫХ КЛЕТОК

TABLE 1. RESULTS OF PHENOTYPING OF THE STUDIED CELLS

Показатель Indicator	Сутки Days			
	0-е сутки 0 th day	7-е сутки 7 th days	14-е сутки 14 th days	21-е сутки 21 st days
CD45⁺ (лимфоциты), % CD45 ⁺ (lymphocytes), %	—	62,3±10,8	60,6±21,9	58,1±14,0
Т-лимфоциты (CD3⁺) T lymphocytes (CD3 ⁺), %	56,9±24,9	44,2±18,1	26,4±20,4	36,8±11,9
НК-клетки (CD16⁺CD56⁺CD3⁻), % NK cells (CD16 ⁺ CD56 ⁺ CD3 ⁻), %	22,6±19,2	49,9±17,0	60,8±13,8	52,8±9,0
Живые НК-клетки от общего количества CD16⁺CD56⁺CD3⁻, % Live NK cells from total CD16 ⁺ CD56 ⁺ CD3 ⁻ , %	99,5±0,6	88,5±2,0	71,0±28,9	59,4±37,2
K562 (CD45^{neg}), %	—	37,7±10,8	39,4±21,9	42,0±14,0
Мертвые K562 от общего количества (CD45^{neg}), % Dead K562 from total (CD45 ^{neg}), %	—	54,4±18,3	74,1±1,0	81,3±6,6
Маркеры активации на лимфоцитах HLA-DR(all), % Activation markers in lymphocytes HLA-DR(all), %	34,1±1,4	87,7±4,2	67,4±27,3	—
CD95⁺(FAS/APO-1), %	81,7±10,4	68,0±0,7	—	—
CD3⁺CD95⁺, %	62,6±3,5	38,6±21,2	—	—

ТАБЛИЦА 2. РЕЗУЛЬТАТЫ ИФА СОВМЕСТНОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ НК-КЛЕТОК ДОНОРОВ И ОНКОЛОГИЧЕСКИХ БОЛЬНЫХ И РАЗЛИЧНЫХ ФИДЕРНЫХ КЛЕТОК (С ГЕННОЙ МОДИФИКАЦИЕЙ – гмK562 И БЕЗ НЕЕ K562), СВОДНАЯ ТАБЛИЦА

TABLE 2. ELISA RESULTS OF CULTIVATION OF NK CELLS AND VARIOUS FEEDER CELLS

Цитокин, пг/мл Cytokine, pg/ml	Фидерные клетки Feeder cells	Сутки Days		
		7-е сутки 7 th days	14-е сутки 14 th days	21-е сутки 21 st days
TNFα	гмK562 gmK562	83,00±36,77	22,50±6,36	30,0±0,0
	K562	20,67±13,87	40,00±16,82	86,33±52,69
	контроль (без фидера) control (without feeder)	4,00±2,83	2,50±0,71	—
IFNγ	гмK562 gmK562	418,50±38,89	325,00±76,37	196,0±0,0
	K562	245,00±77,35	360,33±178,36	534,67±318,30
	контроль (без фидера) control (without feeder)	10,00±9,90	2,50±0,71	—

чество клеток с выраженной противоопухолевой цитолитической активностью [9, 12, 14, 15]. Однако более ранняя продукция цитокинов TNF α и IFN γ наблюдалась в образцах при культивировании НК-клеток онкологических больных и гмK562. Также наибольшего уровня пролиферации НК-клеток к окончанию культивирования удалось достигнуть, после их выделения методом магнитной сепарации и культивирования с гмK562, что является наиболее предпочтительным для получения большого количества НК-клеток. Оба вида фидерных клеток, изучаемых в

данной работе, приемлемы для активации НК-клеток, полученных от доноров или онкологических больных, так как удавалось многократно нарастить количество НК-клеток и увеличить их активационный потенциал, что и являлось целью данной работы.

Благодарности

Выражаем благодарность ООО «СайСторЛаб» за любезно предоставленную клеточную линию K562 и генномодифицированную клеточную линию K562.

Список литературы / References

1. Абакушина Е.В., Маризина Ю.В., Каприн А.Д. Морфофункциональная характеристика лимфоцитов человека после активации *in vitro* // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, 2016. Т. 161, № 5. С. 678-683. [Abakushina E.V., Marizina Y.V., Kaprin A.D. Morphofunctional characteristics of human lymphocytes after *in vitro* activation. *Byulleten eksperimentalnoy biologii i meditsiny = Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2016, Vol. 161, no. 5, pp. 678-683. (In Russ.)]
2. Абакушина Е.В., Маризина Ю.В., Неприна Г.С. Эффективность совместного применения IL-2 и IL-15 для активации цитотоксических лимфоцитов *in vitro* // Гены и клетки, 2015. Т. 10, № 2. С. 78-85. [Abakushina E.V., Marizina Yu.V., Neprina G.S. Efficiency of IL-2 and IL-15 combined use for activation of cytotoxic lymphocytes *in vitro*. *Geny i kletki = Genes and Cells*, 2015, Vol. 10, no. 2, pp. 78-85. (In Russ.)]
3. Абакушина Е.В., Пасова И.А., Маризина Ю.В., Кудрявцев Д.В., Кудрявцева Г.Т., Фомина Е.С. Клиническая эффективность сопроводительной иммунотерапии активированными лимфоцитами больной меланомой (случай из практики) // Сибирский онкологический журнал, 2016. Т. 15, № 5. С. 89-94. [Abakushina E.V., Pasova I.A., Marizina Yu.V., Kudryavtsev D.V., Kudryavtseva G.T., Fomina E.S. Efficiency of adoptive immunotherapy for melanoma: a case report. *Sibirskiy onkologicheskiy zhurnal = Siberian Journal of Oncology*, 2016, Vol. 15, no. 5, pp. 89-94. (In Russ.)]
4. Боробова Е.А., Жеравин А.А. Натуральные киллеры в иммунотерапии онкологических заболеваний // Сибирский онкологический журнал, 2018. Т. 17, № 6. С. 97-104. [Borobova E.A., Zheravin A.A. Natural killer cells in immunotherapy for cancer. *Sibirskiy onkologicheskiy zhurnal = Siberian Journal of Oncology*, 2018, Vol. 17, no. 6, pp. 97-104. (In Russ.)]
5. Вашкевич Е.П., Мигас А.А., Мелешко А.Н., Матвеев М.А., Струшкевич Н.В., Шман Т.В. Экспансия и активация естественных киллерных клеток человека *ex vivo* в присутствии трансгенных фидерных клеточных линий // Цитология, 2020. Т. 62, № 4. С. 258-265. [Vashkevich E.P., Migas A.A., Meleshko A.N., Matveyenko M.A., Strushkevich N.V., Shman T.V. Human Natural Killer cells expansion and activation *ex vivo* in the presence of transgenic feeder cell lines. *Tsitologiya = Cytology*, 2020, Vol. 62, no. 4, pp. 258-265. (In Russ.)]
6. Гривцова Л.Ю. Рецепторный репертуар НК-клеток как молекулярный базис аллореактивности (литературный обзор) // Иммунология гемопоеза, 2018. Т. 16, № 1. С. 62-108. [Grivtsova L.Yu. Receptor repertoire of NK-cells as a molecular basis of alloreactivity (literature review). *Immunologiya getopoeza = Immunology of Hematopoiesis*, 2018, Vol. 16, no. 1, pp. 62-108. (In Russ.)]
7. Лежнин Ю.Н., Христиченко А.Ю., Ратникова Н.М., Кравченко Ю.Е., Чумаков С.П. Клеточная иммунотерапия – современный подход к лечению онкологических заболеваний // Медицинская иммунология, 2018. Т. 20, № 3. С. 313-340. [Lezhnin Yu.N., Khristichenko A.Yu., Ratnikova N.M., Kravchenko Yu.E., Chumakov S.P. Cellular immunotherapy: a modern approach to treatment of oncological diseases. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2018, Vol. 20, no. 3, pp. 313-340. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2018-3-313-340.
8. Непомнящих Т.С., Антонец Д.В., Максютов Р.А. Краткий обзор клинических испытаний средств иммунотерапии онкологических заболеваний // Медицинская иммунология, 2017. Т. 19, № 2. С. 127-144. [Nepomnyashchikh T.S., Antonets D.V., Maksyutov R.A. Short overview of clinical trials with current immunotherapeutic tools for cancer treatment. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2017, Vol. 19, no. 2, pp. 127-144. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2017-2-127-144.
9. Шамова Т.В., Ситковская А.О., Ващенко Л.Н., Кечеджиева Э.Э. Адоптивная клеточная терапия: достижения последних лет // Южно-российский онкологический журнал, 2020. Т. 1, № 1. С. 43-59.

- [Shamova T.V., Sitkovskaya A.O., Vashchenko L.N., Kechedzhieva E.E. Adoptive cell therapy: Current advances. *Yuzhno-rossiyskiy onkologicheskiy zhurnal = South Russian Journal of Cancer*, 2020, Vol. 1, no. 1, pp. 43-59. (In Russ.)]
10. Abakushina E.V., Gel'm Yu.V., Pasova I.A., Bazhin A.V. Immunotherapeutic approaches for the treatment of colorectal cancer. *J. Biochemistry (Moscow)*, 2019, Vol. 84, no. 7, pp. 720-728.
 11. del Zotto G., Marcenaro E., Vacca P., Sivori S., Pende D., Della Chiesa M., Moretta F., Ingegnere T., Mingari M.C., Moretta A., Moretta L. Markers and function of human NK cells in normal and pathological conditions. *J. Cytometry B Clin. Cytom.*, 2017, Vol. 92, no. 2, pp. 100-114.
 12. Fang F., Xiao W., Tian Z. NK cell-based immunotherapy for cancer. *J. Semin Immunol.*, 2017, Vol. 31, pp. 37-54.
 13. Granzin M., Wagner J., Kohl U., Cerwenka A., Huppert V., Ullrich E. Shaping of natural killer cell antitumor activity by *ex vivo* cultivation. *J. Front. Immunol.*, 2017, Vol. 8, 458. doi: 10.3389/fimmu.2017.00458.
 14. Lee D.A. Cellular therapy: Adoptive immunotherapy with expanded natural killer cells. *J. Immunol. Rev.*, 2019, Vol. 1, no. 290, pp. 85-99.
 15. Shin M.H., Kim J., Lim S.A., Kim J., Kim S.J., Lee K.M. NK Cell-Based immunotherapies in cancer. *J. Immune Netw.*, 2020, Vol. 20, no. 2, e14. doi: 10.4110/in.2020.20.e14.
 16. Tarazona R., Lopez-Sejas N., Guerrero B., Hassouneh F., Valhondo I., Pera A., Sanchez-Correa B., Pastor N., Duran E., Alonso C., Solana R. Current progress in NK cell biology and NK cell-based cancer immunotherapy. *J. Cancer Immunol. Immunother.*, 2020, Vol. 5, no. 69, pp. 879-899.

Авторы:

Гельм Ю.В. — научный сотрудник отделения клинической иммунологии, Медицинский радиологический научный центр имени А.Ф. Цыба — филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения РФ, г. Обнинск, Калужская обл., Россия

Пасова И.А. — врач аллерголог-иммунолог отделения клинической иммунологии, Медицинский радиологический научный центр имени А.Ф. Цыба — филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения РФ, г. Обнинск, Калужская обл., Россия

Гривцова Л.Ю. — д.б.н., заведующая отделением клинической иммунологии, Медицинский радиологический научный центр имени А.Ф. Цыба — филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения РФ, г. Обнинск, Калужская обл., Россия

Константинова Т.В. — научный сотрудник отделения клинической иммунологии, Медицинский радиологический научный центр имени А.Ф. Цыба — филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения РФ, г. Обнинск, Калужская обл., Россия

Authors:

Gel'm Yu.V., Research Associate, Department of Clinical Immunology, A. Tsyb Medical Radiological Research Center, Obninsk, Kaluga Region, Russian Federation

Pasova I.A., Clinical Allergologist, Department of Clinical Immunology, A. Tsyb Medical Radiological Research Center, Affiliation of the National Medical Research Center of Radiology, Obninsk, Kaluga Region, Russian Federation

Gritsova L. Yu., PhD, MD (Biology), Head, Department of Clinical Immunology, A. Tsyb Medical Radiological Research Center, Affiliation of the National Medical Research Center of Radiology, Obninsk, Kaluga Region, Russian Federation

Konstantinova T.V., Research Associate, Department of Clinical Immunology, A. Tsyb Medical Radiological Research Center, Affiliation of the National Medical Research Center of Radiology, Obninsk, Kaluga Region, Russian Federation

Михайловский Н.В. — научный сотрудник отдела по разработке и исследованиям в области иммунологии ООО «Текон Медицинские приборы», Москва, Россия

Рыбачук В.А. — лаборант-исследователь отдела по разработке и исследованиям в области иммунологии ООО «Текон Медицинские приборы»; студент магистратуры биологического факультета ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Москва, Россия

Абакушина Е.В. — д.м.н., заместитель генерального директора, руководитель отдела по разработке и исследованиям в области иммунологии ООО «Текон Медицинские приборы», Москва, Россия

Иванов С.А. — д.м.н., профессор РАН, директор Медицинского радиологического научного центра имени А.Ф. Цыба — филиала ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения РФ, г. Обнинск, Калужская обл.; профессор кафедры онкологии и рентгенодиагностики имени В.П. Харченко медицинского института ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», Москва, Россия

Каприн А.Д. — д.м.н., профессор, академик РАН, генеральный директор ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения РФ, г. Обнинск, Калужская обл.; заведующий кафедрой онкологии и рентгенодиагностики имени В.П. Харченко медицинского института ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», Москва, Россия

Mikhailovsky N.V., Research Associate, Department for Development and Research in Immunology, Tekon Medical Devices LLC, Moscow, Russian Federation

Rybachuk V.A., Research Laboratory Assistant, Department for Development and Research in Immunology, Tekon Medical Devices LLC; Master's Student, Faculty of Biology, Lomonosov State University, Moscow, Russian Federation

Abakushina E.V., PhD, MD (Medicine), Deputy General Director, Head, Department for Development and Research in Immunology, Tekon Medical Devices LLC, Moscow, Russian Federation

Ivanov S.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Russian Academy of Sciences, Director, A. Tsyb Medical Radiological Research Center, Affiliation of the National Medical Research Center of Radiology, Obninsk, Kaluga Region; Professor, Department of Oncology and Radiology/Radiology, Medical Institute, Russian University of the People's Friendship, Moscow, Russian Federation

Kaprin A.D., PhD, MD (Medicine), Professor, Full Member, Russian Academy of Sciences, General Director, National Medical Research Center of Radiology, Obninsk, Kaluga Region; Head, Department of Oncology and Radiology/Radiology, Medical Institute, Russian University of the People's Friendship, Moscow, Russian Federation

Поступила 24.02.2022
Принята к печати 06.03.2022

Received 24.02.2022
Accepted 06.03.2022

ВЛИЯНИЕ КОРОТКИХ ПЕПТИДНЫХ ФРАГМЕНТОВ ТБГ НА ЦИТОКИНОВЫЙ ПРОФИЛЬ КРЫС WISTAR ПРИ АЛЛОГЕННОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ IN VIVO

Тимганова В.П.¹, Бочкова М.С.^{1,2}, Шардина К.Ю.¹, Ужвийук С.В.¹,
Гутина Е.В.², Раев М.Б.^{1,2}, Любимов А.В.³, Заморина С.А.^{1,2}

¹ ФГБУН «Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук», г. Пермь, Россия

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

³ Университет Иллинойса, Чикаго, США

Резюме. Трофобластический бета-1-гликопротеин (ТБГ, PSG) — белок плаценты с плейотропными биологическими эффектами, в частности иммунорегуляторным и иммуносупрессивным потенциалом. Применение рекомбинантного ТБГ способно оказывать терапевтический эффект в экспериментах на животных с индуцированными аутоиммунными заболеваниями. В последнее время поиск биологических эффектов коротких линейных пептидов (short linear motifs, SLiMs) является новой стратегией создания фармакологических препаратов. В первичной структуре различных PSG выявлены тетрапептидные участки: YQCE, YECE и YACS, которые являются SLiMs с иммуномодулирующей активностью. Целью исследования является оценка перспектив применения пептидных фрагментов ТБГ в качестве фармакологического препарата для модуляции трансплантационного иммунитета. В работе использовали оригинальную модель реакции «хозяин против трансплантата» на крысах-самцах Wistar без предварительного кондиционирования костного мозга (КМ) у реципиентов. Животным вводили коктейль пептидных фрагментов ТБГ на фоне аллогенной трансплантации клеток КМ в динамическом эксперименте, оценивая цитокиновый профиль как интегральный показатель иммунного ответа. Уровень цитокинов оценивали мультиплексным методом при помощи набора Bio-Plex Pro™ Rat 23-Plex. Статистическую обработку данных проводили, используя двухфакторный дисперсионный анализ и post-hoc тест Тьюки для множественных сравнений. Показано, что в группе животных, которым вводили только КМ, наблюдалось увеличение концентрации провоспалительных цитокинов IFN γ , IL-1 α , IL-1 β , IL-18, а также уровня G-CSF, GM-CSF и IL-7. В группе животных, которым вводили КМ + пептиды ТБГ наблюдалось повышение IFN γ , IL-6, TNF α , которое снижалось к концу эксперимента, и фиксировалось повышение уровня противовоспалительных

Адрес для переписки:

Заморина Светлана Анатольевна
ФГБУН «Институт экологии и генетики
микроорганизмов Уральского отделения Российской
академии наук»
614081, Россия, г. Пермь, ул. Голева, 13.
Тел.: 8 (342) 280-77-94.
Факс: 8 (342) 280-92-11.
E-mail: mantissa7@mail.ru

Address for correspondence:

Zamorina Svetlana A.
Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms,
Ural Branch, Russian Academy of Sciences
614081, Russian Federation, Perm, Golev str., 13.
Phone: 7 (342) 280-77-94.
Fax: 7 (342) 280-92-11.
E-mail: mantissa7@mail.ru

Образец цитирования:

В.П. Тимганова, М.С. Бочкова, К.Ю. Шардина,
С.В. Ужвийук, Е.В. Гутина, М.Б. Раев, А.В. Любимов,
С.А. Заморина «Влияние коротких пептидных
фрагментов ТБГ на цитокиновый профиль крыс Wistar
при аллогенной трансплантации в эксперименте in vivo» // Медицинская иммунология, 2022. Т. 24, № 3.
С. 491-506. doi: 10.15789/1563-0625-EOS-2472
© Тимганова В.П. и соавт., 2022

For citation:

V.P. Timganova, M.S. Bochkova, K.Yu. Shardina,
S.V. Uzhviyuk, E.V. Gutina, M.B. Rayev, A.V. Lyubimov,
S.A. Zamorina "Effect of short PSG peptide fragments on the
cytokine profile in Wistar rats during allogeneic transplantation
in vivo", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya
Immunologiya, 2022, Vol. 24, no. 3, pp. 491-506.
doi: 10.15789/1563-0625-EOS-2472
DOI: 10.15789/1563-0625-EOS-2472

цитокинов IL-4 и IL-13 в сыворотке крови животных на 14-е сутки. Помимо этого, введение пептидов ТБГ приводило к повышению уровня IL-2, M-CSF, MCP-1 и RANTES также на 14-е сутки от начала эксперимента и постепенному снижению их уровня к концу эксперимента, в то время как в контрольной группе сохранялась выраженная тенденция к увеличению концентраций этих и других цитокинов. Таким образом, показано, что применение пептидов ТБГ в процессе развития иммунного ответа на аллотрансплантат ускоряет нормализацию концентраций подавляющего большинства исследованных цитокинов, что свидетельствует об иммунофармакологическом потенциале этих пептидов. Полученные данные могут использоваться для разработки фармакологического препарата на основе исследуемых пептидов для коррекции дисбаланса иммунитета.

Ключевые слова: трофобластический β 1-гликопротеин, аллогенная трансплантация, короткие пептиды, цитокиновый профиль, крысы Wistar

EFFECT OF SHORT PSG PEPTIDE FRAGMENTS ON THE CYTOKINE PROFILE IN WISTAR RATS DURING ALLOGENEIC TRANSPLANTATION *IN VIVO*

Timganova V.P.^a, Bochkova M.S.^{a,b}, Shardina K.Yu.^a, Uzhviyuk S.V.^a, Gutina E.V.^b, Rayev M.B.^{a,b}, Lyubimov A.V.^c, Zamorina S.A.^{a,b}

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

^b Perm State National Research University, Perm, Russian Federation

^c University of Illinois, Chicago, USA

Abstract. Pregnancy-specific beta-1-glycoprotein (PSG) is a protein with pleiotropic biological effects, particularly immunoregulatory and immunosuppressive potential. The use of recombinant PSG may exert therapeutic effects in experimental animals with induced autoimmune diseases. Recently, a search for the biological effects of short linear motifs (SLiMs) has become a new strategy for designing the pharmacological compounds. Tetrapeptide regions have been identified in the primary structure of several PSGs: YQCE, YECE and YACS, these SLiMs exhibit immunomodulatory activity. The aim of our study was to evaluate the prospectives for usage of PSG peptide fragments as pharmacological agents to modulate transplant immunity. We used an original model of host-versus-graft response in male Wistar rats transplanted with bone marrow, without prior conditioning treatment of recipients. We used a cocktail of the PSG peptide fragments administered to Wistar rats in the course of allogeneic bone marrow transplantation (BM) in dynamic manner, evaluating the cytokine profile as an integral index of immune response. Cytokine levels were determined by multiplex method using Bio-Plex Pro™ Rat 23-Plex kit. Statistical processing of the data was performed by means of two-way analysis of variance and Tukey's *post hoc* test for multiple comparisons. We have found that the levels of pro-inflammatory cytokines (IFN γ , IL-1 α , IL-1 β , IL-18), as well as the contents of G-CSF, GM-CSF and IL-7 were increased in the animals injected with BM only. In the group of animals injected with BM + PSG peptides, an increase in IFN γ , IL-6, TNF α was observed, which decreased by the end of the experiment. Increased levels of anti-inflammatory cytokines IL-4 and IL-13 were detected in blood serum of the animals on day +14. Moreover, administration of PSG peptides also led to increase in IL-2, M-CSF, MCP-1, and RANTES levels on day 14 from the beginning of the experiment, and to a gradual decrease in their levels till the end of the experiment. Meanwhile, control group showed a marked tendency for increase of these and other cytokines. Thus, it was shown that the use of PSG peptides upon development of immune response to BM allograft may promote a return to normal levels for the most cytokines studied, thus presuming the immunopharmacological potential of these peptides. The obtained data can be used to develop a pharmacological preparation of the studied peptides to correct the imbalance of immune system.

Keywords: pregnancy-specific β 1-glycoprotein, allogeneic transplantation, short peptides, cytokine profile, Wistar rats

Исследование выполнено при финансовой поддержке правительства Пермского края в рамках научного проекта № С-26/509.

Введение

Трофобластический бета-1-гликопротеин (ТБГ, PSG) — белок с плеiotропными биологическими эффектами, который продуцируется клетками плаценты в период беременности. Концентрация ТБГ в сыворотке к III триместру достигает 200–400 мкг/мл, что значительно превышает концентрации других белков плаценты [3]. ТБГ обладает выраженным иммунорегуляторным потенциалом, регулируя активность основных эффекторов иммунного ответа [5]. Так, известно, что PSG достоверно увеличивает уровень адаптивных Treg *in vitro*, а в отношении активности индоламин-2,3-диоксигеназы (IDO) моноцитов реализует стимулирующий эффект. PSG способен подавлять дифференцировку и пролиферацию интерлейкин-17-продуцирующих Т-хелперов (Th17), а также продукцию ими ключевых провоспалительных цитокинов (IL-8, IL-10, IL-17, IFN γ , MCP-1, TNF α). На уровне Т-клеток иммунной памяти PSG препятствует конверсии наивных Т-клеток в терминально-дифференцированную эффекторную субпопуляцию Т-хелперов. PSG преимущественно подавляет продукцию Th1-цитокинов иммунокомпетентными клетками, но разнонаправленно регулирует продукцию Th2-цитокинов [5]. Применение рекомбинантного ТБГ способно оказывать терапевтический эффект в экспериментах на животных с индуцированными аутоиммунными патологиями [7, 13]. В 2019 г. показан терапевтический эффект ТБГ для подавления реакции отторжения трансплантата [19]. Таким образом, концептуально, ТБГ реализует так называемое «точечное» подавление иммунитета в отношении фетальных антигенов, являясь одним из важнейших факторов, формирующих иммунную толерантность.

Однако практическое применение белков беременности как в нативной, так и в рекомбинантной форме связано с массой сложностей этического и экономического характера. В последнее время поиск биологических эффектов коротких линейных пептидов (short linear motifs, SLiMs) является новой стратегией создания фармакологических препаратов [28]. SLiMs являются высококонсервативными пептидными участками белковой молекулы длиной 3–10 аминокислот, которые разграничивают подлинные синтаксические и семантические единицы в белке. В перспективе они представляют собой новый класс препаратов, способных модулировать внутримолекулярные и межмолекулярные связи белков [23]. Например, уже существует целый

ряд препаратов, на основе SLiMs, которые имитируют или блокируют конкретное белок-белковое взаимодействие: Tritace[®], Vasotec[®], Accupril[®], Lotensin[®], Zovirax[®], Stutnet[®], Gleevec[®], Sprycel[®]. Важно отметить, что в последние годы половина всех одобренных пептидных препаратов были линейными пептидами [6].

В первичной структуре различных PSG выявлены тетрапептидные участки: YQCE (присутствует во всех PSG), YECE и YACS (присутствуют в большинстве типов PSG), являющиеся консенсусным мотивом YxCx (в данном случае, SLiMs), у которого выявлена иммуномодулирующая активность [26].

Таким образом, целью исследования является изучение влияния коротких пептидных фрагментов (SLiMs) ТБГ (YECE, YQCE, YVCS и YACS) на цитокиновый профиль при формировании иммунного ответа на введение аллогенных клеток костного мозга в экспериментальной модели крыс Wistar.

Известно, что изменения в иммунной системе реципиента на введение аллогенных клеток костного мозга происходят в первые 1–3 недели после трансплантации [27]. Цитокиновый профиль в данном случае является интегральным показателем развития иммунного ответа [18]. Прикладным аспектом исследования является оценка перспектив применения пептидных фрагментов ТБГ в качестве фармакологического препарата для лечения нежелательных эффектов аллотрансплантации. Полученные данные могут использоваться для разработки научно обоснованных технологий коррекции дисбаланса иммунитета, особенно для аутоиммунных заболеваний в виде фармакологического препарата на основе исследуемых пептидов.

Материалы и методы

В эксперименте задействованы самцы крыс линии Wistar (n = 36) в возрасте от 2–3 месяцев (m $\approx$ 250 г). Животные содержались в виварии ПГНИУ в условиях, соответствующих ГОСТ 33216-2014 «Правила работы с лабораторными грызунами и кроликами».

Схема эксперимента

В работе использовали оригинальную модель реакции «хозяин против трансплантата» (РХПТ), разработанную по аналогии с моделью реакции «трансплантат против хозяина» [17]. Известно, что при полноценной трансплантации костного мозга на животных моделях с кондиционированием костного мозга реципиента и последующей иммуносупрессивной терапией наблюдается высокая смертность экспериментальных животных [8, 39]. В нашей модели животным вводили аллогенную суспензию клеток костного мозга

внутрибрюшинно без кондиционирования и базовой иммуносупрессивной терапии, что позволяет адекватно оценить иммунный ответ по цитокиновому профилю без экстремальных воздействий.

Животные были разделены на 3 группы: 1-я (n=4) — интактные животные; 2-я — контроль (n=16), которым внутрибрюшинно вводили взвесь костного мозга (КМ) (10^7 клеток, обработанных камптотецином (50 мкг/мл, Tocris Bioscience, Великобритания) в 100 мкл физиологического раствора; 3-я — опыт (n=16), которым вводили клетки костного мозга, а затем внутримышечно вводили смесь 4 исследуемых коротких пептидов ТБГ в объеме 100 мкл физиологического раствора на 0-е, 3-и, 6-е, 9-е и 12-е сутки (рис. 1).

Клетки костного мозга выделяли из бедренных костей, подсчитывали и обрабатывали камптотецином (50 мкг/мл) в среде RPMI-1640 в течение 1 часа при температуре 37 °С для того, чтобы исключить деление клеток и возможность развития реакции трансплантат против хозяина (РТПХ) [31]. Далее клетки отмывали физиологическим раствором, доводили до концентрации

$10^7/100$ мкл и вводили 32-м животным внутрибрюшинно. В работе применяли пептиды ТБГ (YACS, YQCE, YVCS, YECE), синтезированные на заказ ООО «Рашн пептайд» (Россия), предварительно очищенные нами от эндотоксина при помощи колонок Pierce™ High Capacity Endotoxin Removal Spin Columns производства Thermo Scientific (США). Далее объединяли по 12,5 мкг каждого пептида и вводили по 50 мкг смеси в 100 мкл апиrogenного физиологического раствора. Таким образом, в исследовании применяли коктейль пептидов YACS, YQCE, YVCS, YECE в качестве экспериментальной терапии РХПТ.

Выведение животных из эксперимента проводилось на 3-и, 7-е, 14-е и 21-е сутки после аллотрансплантации (АТ) путем декапитации в соответствии с международными правилами проведения работ с экспериментальными животными. Одновременно выводили по 4 крысы из каждой экспериментальной группы (в группе интактных крыс — по 1), одновременно производя забор крови (рис. 1). Далее клетки крови осаждали 15 минут на 1500 об/мин, отбирали сыворотку крови, которую затем осветляли

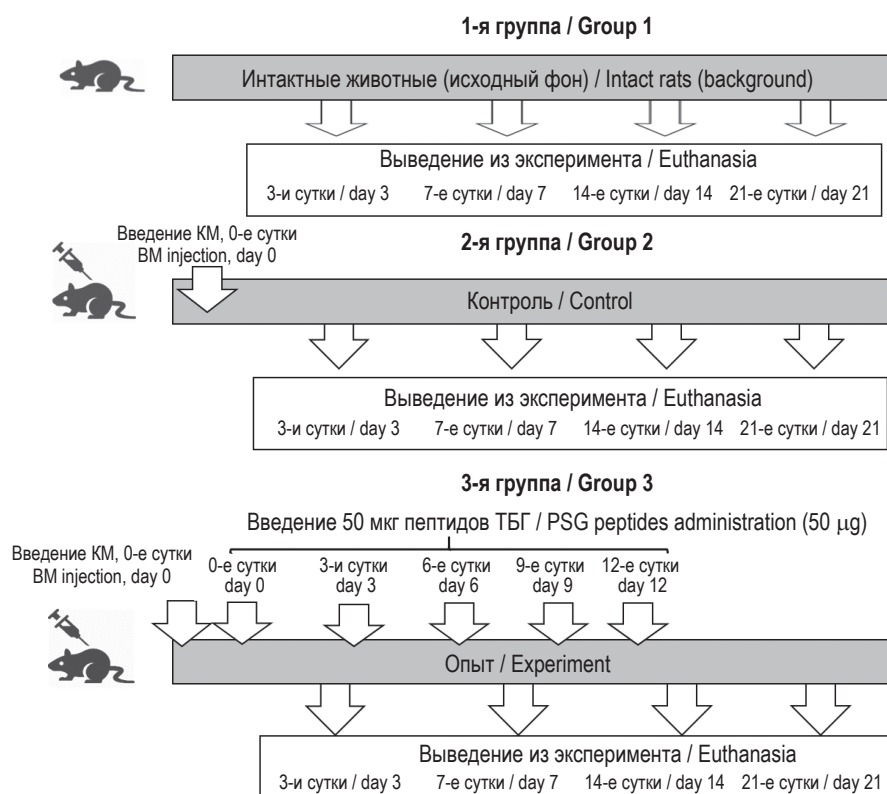


Рисунок 1. Схема проведения экспериментов по изучению влияния пептидов ТБГ на реакцию хозяин против трансплантата

Примечание: КМ — костный мозг.

Figure 1. Scheme of experiments to study the effect of PSG peptides on the host-versus-graft reaction

Note. BM, bone marrow.

центрифугированием на 14 000 об/мин в течение 30 мин при $t\ 4^{\circ}\text{C}$.

Измерение концентрации цитокинов в сыворотке крови крыс

Для определения уровня цитокинов / хемокинов / ростовых факторов G-CSF, GM-CSF, фактора роста и миграции кератиноцитов (GRO/KC), $\text{IFN}\gamma$, IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-10, IL-12 (p70), IL-13, IL-17A, IL-18, макрофагального колониестимулирующего фактора (M-CSF), MCP-1, MIP-1 α , MIP-3 α , RANTES, TNF α , VEGF в плазме крыс использовали коммерческий набор Bio-Plex Pro™ Rat Cytokine Magnetic Bead Panel 23-Plex производства BioRad Laboratories, Inc. (США). Считывание результатов проводили на мультиплексном анализаторе MAGPIX (BioRad Laboratories, Inc., США) по технологии Luminex xMAP с использованием программного обеспечения xPONENT 3.1. Для построения стандартных кривых использовали пятипараметрический логистический (5PL) метод анализа. Основные метрологические характеристики применяемого метода определения растворимых клеточных факторов в плазме: минимальное определяемое количество 10^{-3} пг/мл, погрешность определения (CV%) $\pm 7\%$ в пределах одного определения (intraassay), $\pm 10\%$ — для определений по разным стандартным графикам (interassay). Обработку полученных данных осуществляли в программе BioPlex Pro Manager. Статистическую обработку данных проводили с помощью программы GraphPad Prism 8, используя двухфакторный дисперсионный анализ (two-way ANOVA) и post-hoc тест Тьюки для множественных сравнений. Сравнивали показатели концентраций цитокинов на 3-и, 7-е, 14-е и 21-е сутки после АТ внутри каждой группы, а также в конкретной временной точке разных групп животных (интактной, контрольной и опытной). Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$. В таблицах представлены только значения для статистически значимых отличий.

Результаты

Изменения уровней провоспалительных цитокинов на фоне аллотрансплантации и введения коротких пептидов ТБГ

Аллотрансплантация клеток костного мозга (контрольная группа животных) приводила к повышению концентраций провоспалительных факторов, а именно: IL-1 β на 14-е и 21-е сутки, а $\text{IFN}\gamma$, IL-1 α и IL-18 только на 21 сутки от начала эксперимента по отношению к показателям интактных крыс (табл. 1).

Введение пептидов ТБГ на фоне аллотрансплантации костного мозга приводило к статистически значимому повышению уровня IL-1 β

по сравнению с исходным фоном (интактные крысы) на 3-и сутки после АТ. Концентрация этого цитокина возрастала по отношению к группе интактных животных в 5 раз, а по отношению к контролю (тоже статистически значимо) более чем в 2 раза. Затем, на 14-е и 21-е сутки после АТ концентрация IL-1 β снижалась до значений ниже, чем в контрольной группе. Однако показатели все еще были выше, чем в интактной группе, статистически значимых отличий в эти сроки по отношению к контролю обнаружено не было (табл. 1).

Концентрации $\text{IFN}\gamma$, IL-6 и TNF α в группе животных, которым вводились пептиды ТБГ, возрастали на 14-е сутки от начала эксперимента по сравнению с интактными животными и по сравнению с 3-ми сутками после АТ в этой же группе, однако к 21-м суткам происходило снижение уровня этих цитокинов в сыворотке крови (табл. 1). Обращает на себя внимание, что через 21 сутки после аллотрансплантации в контрольной группе сохраняется тенденция к нарастанию уровня провоспалительных цитокинов, в то время как в группе животных, которым вводили пептиды ТБГ, наоборот, наблюдается выраженная тенденция к снижению таких факторов воспаления как IL-1 α , IL-1 β , IL-17A, IL-18, а также в статистически значимом снижении концентраций $\text{IFN}\gamma$ и IL-6 по отношению к 14-м суткам после АТ.

Изменения уровней противовоспалительных цитокинов на фоне аллотрансплантации и введения коротких пептидов ТБГ

Аллотрансплантация клеток костного мозга животным не приводила к статистически значимым изменениям уровней противовоспалительных цитокинов в сыворотке крови по сравнению с группой интактных крыс, хотя тенденция к их увеличению наблюдалась (табл. 2).

Интересно, что в группе животных, которым вводили пептиды ТБГ (опытная группа), наблюдалось статистически значимое увеличение концентраций IL-4, IL-10 и IL-13 на 14-е сутки, а IL-13 еще и на 21-е сутки после начала эксперимента по сравнению с интактными животными (табл. 2).

Уровни IL-4 и IL-13 в опытной группе нарастали с 3-х по 14-е сутки после АТ, чего не наблюдалось в контрольной группе (рис. 2, 3).

Изменения уровней регуляторных цитокинов и колониестимулирующих факторов на фоне аллотрансплантации и введения коротких пептидов ТБГ

На фоне аллотрансплантации клеток костного мозга, у животных наблюдалось повышение уровней колониестимулирующих факторов (G-CSF, GM-CSF) на 14-е сутки и лимфопоэтического фактора роста (IL-7) на 14-е и 21-е сутки

ТАБЛИЦА 1. КОНЦЕНТРАЦИИ ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ СЫВОРОТКИ КРОВИ КРЫС WISTAR ПРИ АЛЛОГЕННОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ И ВВЕДЕНИИ КОРОТКИХ ПЕПТИДОВ ТБГ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ *IN VIVO*, пг/мл, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 1. CONCENTRATIONS OF PRO-INFLAMMATORY CYTOKINES IN THE BLOOD SERUM OF WISTAR RATS AFTER ALLOGENEIC TRANSPLANTATION AND ADMINISTRATION OF SHORT PSG PEPTIDES IN THE EXPERIMENT *IN VIVO*, pg/mL, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

	IFN γ	IL-1 α	IL-1 β	IL-6	IL-17A	IL-18	TNF α
Интактные Intact	205,91 (188,53-241,57)	236,43 (198,89-271,13)	62,02 (53,22-75,05)	262,70 (259,38-307,72)	33,72 (30,05-41,62)	2427,39 (1941,47-2830,98)	681,15 (660,15-760,61)
3-и сутки / day 3							
Контроль Control	459,41 (402,05-581,68)	291,52 (268,33-336,97)	122,45 (106,02-137,92) p = 0,027*	582,03 (422,82-783,43)	56,23 (52,90-68,05)	2462,59 (2191,91-3066,95)	848,73 (711,59-1186,90)
Пептиды ТБГ PSG peptides	515,13 (456,07-564,75) p = 0,013*	420,19 (379,40-437,93)	310,42 (211,51-389,20) p = 0,001** p = 0,020#	577,11 (557,80-639,98) p = 0,040*	77,11 (71,70-83,81)	3283,31 (2566,44-4103,72)	660,15 (644,38-689,34) p = 0,014*
7-е сутки / day 7							
Контроль Control	447,45 (343,28-567,33)	323,25 (260,87-351,21)	111,18 (92,26-135,64) p = 0,021*	683,28 (503,96-805,35)	49,58 (41,95-62,14)	3158,74 (3053,52-3513,09)	798,73 (648,72-1032,23)
Пептиды ТБГ PSG peptides	483,19 (428,15-638,80)	147,39 (89,30-316,99)	177,53 (132,37-223,73)	438,53 (344,00-749,51)	94,29 (68,19-125,86)	5073,70 (1675,10-8458,15)	829,21 (511,38-1385,84)
14-е сутки / day 14							
Контроль Control	617,26 (546,59-653,56)	319,73 (293,33-339,04)	248,96 (193,01-340,19) p = 0,002**	548,29 (472,21-658,78)	75,60 (69,64-83,95)	2920,27 (2582,69-3089,07)	881,67 (769,84-1098,27)
Пептиды ТБГ PSG peptides	857,83 (792,25-1022,32) p < 0,0001**	399,67 (360,76-428,67)	181,83 (175,94-234,43) p = 0,027**	1061,53 (904,89-1302,57) p < 0,001**	93,35 (83,41-101,37)	4739,98 (4206,82-5182,77)	1555,22 (1278,84-1752,47) p = 0,027**
21-е сутки / day 21							
Контроль Control	692,76 (631,03-734,69) p = 0,013**	492,19 (435,43-520,97) p = 0,017**	222,54 (183,62-292,97) p = 0,008**	727,56 (571,06-829,50)	99,51 (92,09-105,55)	5026,48 (4390,23-6240,99) p = 0,028**	902,59 (808,52-1067,55)
Пептиды ТБГ PSG peptides	487,20 (346,34-616,02) p = 0,007*	356,65 (351,41-386,44)	200,72 (163,91-259,34) p = 0,036**	485,94 (380,95-659,27) p = 0,017*	75,15 (67,76-141,10) p = 0,006**	3393,67 (2513,18-4483,97)	1081,64 (997,69-1183,99)

Примечание. Указаны значения p (двухфакторный дисперсионный анализ) только < 0,05; * – статистически значимые различия внутри группы по отношению к 14-м суткам после аллотрансплантации (АТ); ** – к группе интактных крыс; # – к контролю.

Note. Only p < 0.05 (two-way ANOVA) are given; *, statistically significant differences within the group in relation to 14 days after allotransplantation (AT); **, to intact rats group; #, to control.

ТАБЛИЦА 2. КОНЦЕНТРАЦИИ ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ СЫВОРОТКИ КРОВИ КРЫС WISTAR ПРИ АЛЛОГЕННОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ И ВВЕДЕНИИ КОРОТКИХ ПЕПТИДОВ ТБГ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ *IN VIVO*, пг/мл, Ме ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

TABLE 2. CONCENTRATIONS OF ANTI-INFLAMMATORY CYTOKINES IN THE BLOOD SERUM OF WISTAR RATS AFTER ALLOGENEIC TRANSPLANTATION AND ADMINISTRATION OF SHORT PSG PEPTIDES IN THE EXPERIMENT *IN VIVO*, pg/mL, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

	IL-4	IL-10	IL-13
Интактные Intact	158,53 (113,90-187,32)	135,83 (106,17-171,59)	60,56 (60,56-71,76)
3-и сутки / day 3			
Контроль Control	190,12 (143,92-230,72)	188,21 (160,79-219,27)	121,62 (97,65-199,82)
Пептиды ТБГ PSG peptides	229,69 (204,68-243,00)	239,00 (205,69-256,68) p = 0,041**	136,53 (114,30-149,30) p = 0,008***
7-е сутки / day 7			
Контроль Control	196,50 (184,21-233,34)	137,01 (129,89-170,20)	84,71 (81,02-129,86)
Пептиды ТБГ PSG peptides	223,81 (140,51-330,78)	82,4 (75,25-127,88)	170,45 (134,33-281,83)
14-е сутки / day 14			
Контроль Control	189,88 (141,54-216,30)	168,50 (153,00-178,61)	254,47 (228,50-269,59)
Пептиды ТБГ PSG peptides	353,39 (283,43-377,18) p = 0,024*	270,06 (249,69-277,18) p = 0,018* p = 0,004**	369,38 (306,82-458,18) p = 0,001*
21-е сутки / day 21			
Контроль Control	243,89 (225,50-258,79)	227,00 (205,18-240,60)	238,8 (221,08-253,42)
Пептиды ТБГ PSG peptides	229,6 (199,37-252,42)	200,89 (178,04-222,29)	199,68 (136,20-364,38) p = 0,031*

Примечание. Указаны значения p (двухфакторный дисперсионный анализ) только < 0,05; * – статистически значимые различия по отношению к группе интактных крыс; ** – внутри группы по отношению к 7-м суткам после АТ; *** – внутри группы по отношению к 14-м суткам после АТ.

Note. Only p < 0.05 (two-way ANOVA) are given; *, statistically significant differences in relation to the group of intact rats; **, within the group in relation to 7 days after AT; ***, within the group in relation to 14 days after AT.

от начала эксперимента, однако концентрации других регуляторных и ростовых факторов не изменялись по сравнению с группой интактных животных (табл. 3).

Статистически значимый эффект коротких пептидов ТБГ был обнаружен только в отношении IL-2. Его уровень повышался на 14-е сутки после АТ в опытной группе в сравнении с показателями животных контрольной группы.

Как уже было упомянуто, аллотрансплантация приводила к статистически значимому повышению концентрации IL-7 на 14-е и 21-е сутки после начала эксперимента по отношению к значениям интактных животных и по отношению к

3-м суткам, однако введение животным пептидов ТБГ отменяло этот эффект. Статистически значимых отличий между контрольной и опытной группами выявлено не было, однако можно наблюдать тенденцию к снижению уровня этого цитокина начиная с 7-х суток после АТ у животных, которым вводили исследуемые пептиды.

Концентрация IL-12 не изменялась в обеих группах животных на протяжении всего эксперимента.

В опытной группе животных наблюдалось достоверное по отношению к интактным крысам увеличение концентрации фактора роста эндотелия (VEGF) (табл. 3). Отметим, что в опытной

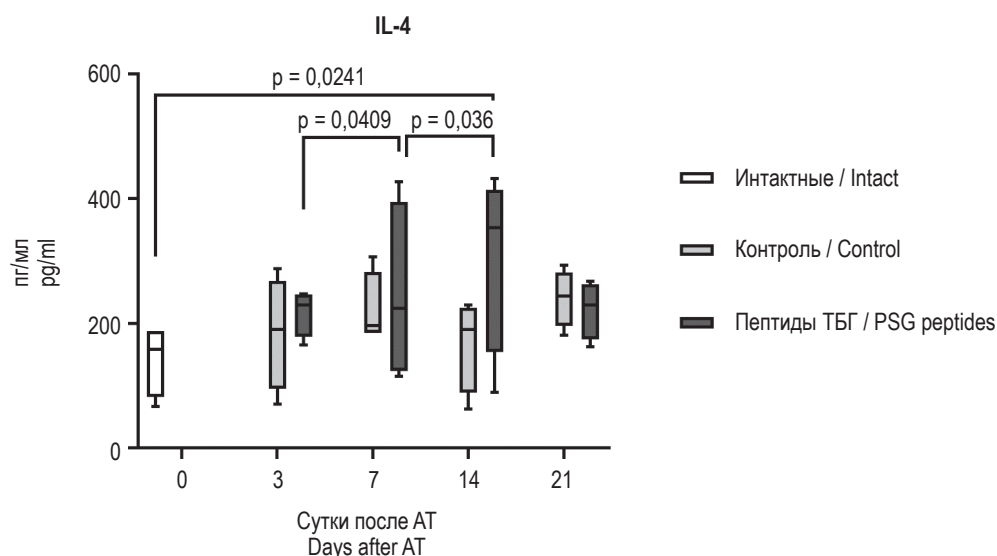


Рисунок 2. Концентрация IL-4 в сыворотке крови крыс при аллогенной трансплантации КМ и введении коротких пептидов ТБГ

Примечание. Представлены медианы, первый и третий квартили, минимальное и максимальное значения. Указаны значения $p < 0,05$ (двухфакторный дисперсионный анализ).

Figure 2. Concentration of IL-4 in the blood serum of rats after allogeneic BM transplantation and administration of short PSG peptides

Note. Medians, first and third quartiles, minimum and maximum values are presented. $p < 0.05$ values are given (two-way ANOVA).

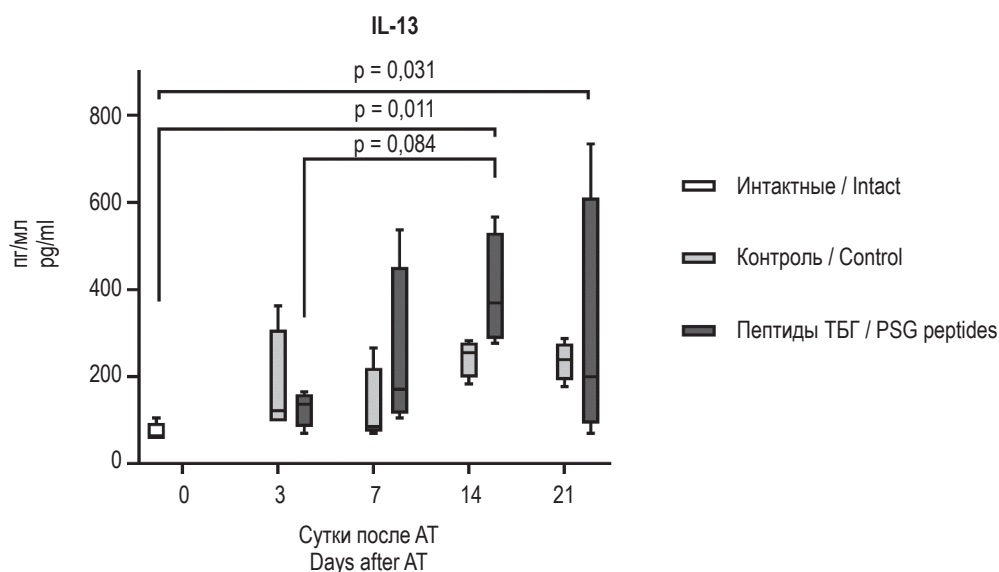


Рисунок 3. Концентрация IL-13 в сыворотке крови крыс при аллогенной трансплантации КМ и введении коротких пептидов ТБГ

Примечание. См. примечание к рисунку 2.

Figure 3. Concentration of IL-13 in the blood serum of rats after allogeneic BM transplantation and administration of short PSG peptides

Note. As for Figure 2.

группе животных концентрация этого фактора выше, чем в контрольной на протяжении всего эксперимента. Даже на 21-е сутки после введения клеток КМ под действием пептидов ТБГ уровень VEGF был выше, чем в интактной груп-

пе в среднем в 3,5 раза, тогда как в опытной — в 5,5 раза.

Концентрация М-CSF в опытной группе крыс повышалась на 14-е и 21-е сутки по отношению с 3 сутками после АТ. А уровни G-CSF и GM-CSF

ТАБЛИЦА 3. КОНЦЕНТРАЦИИ РЕГУЛЯТОРНЫХ ЦИТОКИНОВ И КОЛОНИЕСТИМУЛИРУЮЩИХ ФАКТОРОВ СЫВОРОТКИ КРОВИ КРЫС WISTAR ПРИ АЛЛОГЕННОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ И ВВЕДЕНИИ КОРОТКИХ ПЕПТИДОВ ТБГ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ *IN VIVO*, пг/мл, Ме ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

TABLE 3. CONCENTRATIONS OF REGULATORY CYTOKINES AND COLONY-STIMULATING FACTORS IN THE BLOOD SERUM OF WISTAR RATS AFTER ALLOGENEIC TRANSPLANTATION AND ADMINISTRATION OF SHORT PSG PEPTIDES IN THE EXPERIMENT *IN VIVO*, pg/mL, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

	IL-2	IL-7	IL-12 (p70)	VEGF	M-CSF	G-CSF	GM-CSF	IL-5
Интактные Intact	904,71 (755,86- 1057,86)	86,63 (81,30- 90,01)	204,29 (173,28- 244,76)	24,05 (22,21- 28,36)	27,8 (19,20- 38,37)	9,62 (8,03- 11,08)	60,84 (56,98- 64,76)	673,46 (592,61- 725,21)
3-и сутки / day 3								
Контроль Control	922,59 (770,42- 1314,60)	107,26 (88,20- 132,87) p = 0,020** p = 0,021***	281,54 (260,64- 350,76)	54,08 (39,33- 70,22)	29,51 (27,14- 40,25)	12,00 (10,94- 16,11)	79,17 (66,06- 99,49)	726,46 (668,22- 802,87)
Пептиды ТБГ PSG peptides	837,41 (743,97- 929,50) p = 0,0001**	158,46 (122,97- 190,13)	465,41 (410,05- 508,41)	104,67 (69,09- 136,30)	31,14 (25,06- 39,06) p = 0,037**	14,94 (12,17- 16,85)	135,13 (94,05- 171,59)	944,47 (924,91- 957,41)
7-е сутки / day 7								
Контроль Control	1057,31 (1053,62- 1325,34)	132,95 (116,99- 148,40)	310,45 (233,67- 385,32)	60,76 (43,10- 80,69)	52,91 (47,08- 63,51)	15,68 (12,50- 17,65)	95,24 (74,37- 122,18)	818,66 (724,99- 1045,86)
Пептиды ТБГ PSG peptides	1153,01 (774,60- 1561,11) p = 0,002**	101,26 (92,53- 143,44)	377,08 (312,97- 539,38)	92,66 (87,11- 135,32) p = 0,019*	30,75 (30,11- 45,49)	20,86 (14,17- 26,02)	104,44 (78,89- 144,46)	677,81 (436,03- 990,59)
14-е сутки / day 14								
Контроль Control	1474,67 (1335,25- 1700,13)	230,31 (180,61- 312,61) p = 0,004*	310,31 (290,84- 329,37)	67,30 (59,36- 82,08)	62,67 (56,80- 66s,29)	27,34 (21,82- 36,72)	193,83 (151,29- 263,74)	717,31 (637,78- 758,62)
Пептиды ТБГ PSG peptides	2359,46 (2225,62- 2789,35) P = 0,0002* p = 0,007*** p = 0,029#	171,25 (138,69- 226,42)	453,12 (385,24- 520,56)	119,59 (87,20- 147,73)	65,76 (56,29- 74,38) p = 0,044***	22,88 (19,33- 27,65) p = 0,009*	151,95 (125,25- 220,82) p = 0,004*	885,37 (754,66- 949,04)
21-е сутки / day 21								
Контроль Control	1618,30 (1496,67- 1716,85)	229,70 (186,66- 305,26) p = 0,004*	506,92 (448,79- 612,63)	78,00 (70,10- 91,48)	29,25 (27,68- 33,30)	21,29 (19,03- 25,27)	161,21 (147,51- 181,60)	900,35 (811,08- 953,21)
Пептиды ТБГ PSG peptides	1420,77 (1251,04- 1530,63)	188,16 (152,58- 239,63)	391,53 (379,15- 464,92)	132,92 (79,68- 204,20) p = 0,003*	37,89 (29,85- 40,61)	14,92 (12,46- 26,04)	162,72 (116,44- 246,31)	764,68 (749,31- 819,23)

Примечание. Указаны значения p (двухфакторный дисперсионный анализ) только < 0,05; * – статистически значимые различия по отношению к группе интактных крыс; ** – внутри группы по отношению к 14-м суткам после АТ; *** – внутри группы по отношению к 21-м суткам после АТ; # – по отношению к контрольной группе.

Note. Only p values < 0.05 are given (two-way ANOVA); *, statistically significant differences in relation to the group of intact rats; **, within the group in relation to 14 days after AT; ***, within the group in relation to 21 days after AT; #, in relation to the control group.

ТАБЛИЦА 4. КОНЦЕНТРАЦИИ ХЕМОКИНОВ СЫВОРОТКИ КРОВИ КРЫС WISTAR ПРИ АЛЛОГЕННОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ И ВВЕДЕНИИ КОРОТКИХ ПЕПТИДОВ ТБГ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ *IN VIVO*, пг/мл, Ме ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

TABLE 4. SERUM CHEMOKINE CONCENTRATIONS IN WISTAR RATS AFTER ALLOGENEIC TRANSPLANTATION AND ADMINISTRATION OF SHORT PSG PEPTIDES IN THE EXPERIMENT *IN VIVO*, pg/mL, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

	GRO/KC	MCP-1	MIP-1 α	MIP-3 α	RANTES
Интактные Intact	48,14 (47,11-52,50)	1002,01 (965,46-1064,72)	45,84 (40,14-48,29)	25,30 (17,53-34,23)	455,38 (396,46-525,35)
3-и сутки / day 3					
Контроль Control	112,70 (103,84-157,91)	1472,92 (1190,72-2038,31)	36,17 (35,09-46,56)	27,37 (25,73-33,71)	881,89 (738,71-1293,14)
Пептиды ТБГ PSG peptides	262,43 (243,08-283,35) p = 0,0016*	2827,4 (2768,22-2927,25) p < 0,0001* p = 0,0001** p = 0,0047*** p = 0,0133**** p = 0,0242#	86,39 (77,17-96,53) p = 0,0405*	26,33 (23,05-31,04)	2690,88 (2585,18-2868,97) p < 0,0001* p = 0,0002*** p = 0,0001**** p = 0,0192#
7-е сутки / day 7					
Контроль Control	96,3 (66,97-128,82)	1368,22 (1314,38-1604,61)	43,52 (33,96-54,34)	28,46 (21,04-38,47)	574,09 (335,33-1327,33)
Пептиды ТБГ PSG peptides	156,62 (72,41-246,76)	821,49 (716,42-1090,62)	55,59 (42,89-69,09)	28,77 (25,42-36,47)	1721,96 (1150,21-2368,39) p = 0,0315**** p = 0,0104*
14-е сутки / day 14					
Контроль Control	119,32 (104,51-145,83)	957,80 (811,65-1055,12)	47,88 (39,27-63,15)	27,84 (25,04-29,48)	440,88 (355,64-581,32)
Пептиды ТБГ PSG peptides	170,33 (129,71-209,74) p = 0,0054*	1628,27 (1377,20-1784,00)	43,75 (41,55-54,46)	39,27 (34,50-44,65)	939,14 (762,86-1085,35)
21-е сутки / day 21					
Контроль Control	151,06 (135,35-159,96)	1573,35 (1446,41-1667,61)	70,98 (56,13-95,80)	31,09 (28,71-32,98)	964,5 (884,00-1089,19)
Пептиды ТБГ PSG peptides	166,96 (143,79-278,93) p = 0,0025*	1543,73 (1356,09-1858,53)	45,69 (36,02-67,92)	34,48 (28,49-40,28)	607,28 (574,41-669,80)

Примечание. Указаны значения p (двухфакторный дисперсионный анализ) только < 0,05; * – статистически значимые различия по отношению к группе интактных крыс; ** – внутри группы по отношению к 7-м суткам после АТ; *** – внутри группы по отношению к 14-м суткам после АТ; **** – внутри группы по отношению к 21-м суткам после АТ; # – по отношению к контрольной группе.

Note. Only p values < 0.05 are given (two-way ANOVA); *, statistically significant differences in relation to the group of intact rats; **, within the group in relation to 7 days after AT; ***, within the group in relation to 14 days after AT; **** – within the group in relation to 21 days after AT; #, in relation to the control group.

повышались в этой же группе животных на 14-е сутки после АТ и только по отношению к интактным крысам.

Изменения уровней хемокинов на фоне аллогенной трансплантации и введения коротких пептидов ТБГ

Введение клеток КМ животным не влияло на уровень хемокинов в сыворотке крови по сравнению с группой интактных животных (табл. 4). У животных на фоне аллотрансплантации КМ и введения пептидов ТБГ на 3-и сутки происходило статистически значимое повышение уровня таких хемокинов как MCP-1 и RANTES в сыворотке крови по отношению к контрольной группе. На фоне дальнейшего введения пептидов ТБГ концентрации этих хемокинов в сыворотке крови снижались на 7-е, 14-е и 21-е сутки от начала эксперимента. Интересно, что и при исследовании концентраций хемокинов на 21-е сутки от начала эксперимента тенденция к увеличению их уровня в контрольной группе сменялась на тенденцию к снижению в опытной группе.

Обсуждение

Известно, что воспалительные и иммунные реакции, как в норме, так и при патологии, являются результатом регуляторных взаимодействий многочисленных систем организма, связующим звеном между которыми являются цитокины (интерлейкины, колониестимулирующие и ростовые факторы, интерфероны, хемокины и др.) [41]. Обладая как провоспалительным, так и противовоспалительным действием, цитокины осуществляют регуляторную функцию не только внутри иммунной системы, но и обеспечивают многокомпонентные связи с нервной и эндокринной системами организма [36]. Следовательно, для раскрытия неизвестных на сегодняшний день патогенетических механизмов формирования воспалительного процесса в ходе аллотрансплантации и защитного эффекта пептидов ТБГ представляется важным изучение цитокинового профиля как интегрального показателя иммунного ответа.

В нашем исследовании введение суспензии КМ и реакция отторжения аллотрансплантата, подтвержденная морфологическими исследованиями (данные не приводятся), сопровождалась существенными изменениями цитокинового профиля (табл. 1, 2, 3, 4).

Повышение концентраций провоспалительных факторов на фоне аллотрансплантации (IL-1 β , IFN γ , IL-1 α и IL-18) (табл. 1) согласуется с данными литературы [35, 43].

Очевидно, что аллотрансплантация гематopoэтических стволовых клеток КМ животным приводит к РХПТ. В наших экспериментах мы

показали, что в группе животных, которым проводили аллотрансплантацию КМ наблюдалось увеличение концентрации провоспалительных факторов – IFN γ , IL-1 α , IL-1 β , IL-18 в сыворотке крови, что свидетельствует о запуске воспалительного ответа на трансплантат, т.е. его отторжения. Полученные нами данные соответствуют литературным, где показано увеличение концентраций IL-1, IFN γ , TNF α при отторжении трансплантата [35, 40, 43].

Введение пептидов ТБГ на фоне аллотрансплантации костного мозга приводило к статистически значимому повышению уровня IL-1 β по сравнению с контролем более чем в 2 раза на 3-и сутки после АТ. К концу эксперимента концентрация IL-1 β в опытной группе снижалась, статистически значимых отличий между группами обнаружено не было. Повышение IL-1 β , «классического» провоспалительного цитокина в условиях трансплантации нежелательно в силу его участия в процессах острого отторжения [34].

Интересно, что в отличие от IL-1 β , концентрации IFN γ , IL-6 и TNF α в группе животных, которым вводились пептиды ТБГ, возрастали только через 2 недели после начала эксперимента, а через три недели наблюдалась выраженная тенденция к снижению факторов воспаления, что может быть связано как с толерогенным действием коктейля пептидов ТБГ, так и, напротив, с усилением иммунного ответа в ранние сроки после АТ, приводящему к ускорению разрушения введенных аллогенных клеток. Ответить на вопрос, произошло ли усиление иммунной реакции в ранние сроки после АТ под влиянием коротких пептидов ТБГ помогут морфологические исследования гистологических препаратов места введения аллогенных клеток.

Аллотрансплантация клеток костного мозга животным статистически значимо не изменяла уровень противовоспалительных цитокинов, однако в группе животных, которым вводили пептиды ТБГ (опытная группа), наблюдалось статистически значимое увеличение концентраций IL-4, IL-10 и IL-13 на 14-е сутки, а IL-13 еще и на 21-е сутки после начала эксперимента по сравнению с интактными животными. Кроме того, по отношению к началу эксперимента уровни IL-4 и IL-13 в опытной группе нарастали к 14-м суткам после АТ, чего не наблюдалось в контрольной группе (рис. 2, 3). Известно, что эти цитокины рассматриваются как одни из важнейших факторов в индукции толерантности [11]. В нашем эксперименте уровень IL-13 на 14-е сутки после АТ на фоне введения пептидов ТБГ возрастал по сравнению с интактными животными в среднем в 6 раз, тогда как в контрольной группе – всего лишь в 4 раза. Именно этот цитокин, как было

показано, может продлевать выживаемость аллотрансплантата, ингибируя индукцию мРНК IL-12, TNF α и iNOS в дендритных клетках и/или макрофагах [11]. В целом, как и в случае с провоспалительными факторами, уровень противовоспалительных цитокинов в опытной группе (пептиды ТБГ) к 21-м суткам имел тенденцию к снижению. Хотя статистически значимых отличий между контрольной и опытной группами выявлено не было, обнаруженные эффекты пептидов ТБГ внушают оптимизм и задают вектор дальнейшим исследованиям.

Что касается регуляторных цитокинов и колониестимулирующих факторов, на фоне аллотрансплантации клеток костного мозга у животных наблюдалось повышение концентраций только G-CSF, GM-CSF на 14-е сутки от начала эксперимента. В опытной группе крыс к повышению этих двух колониестимулирующих факторов добавлялось и повышение M-CSF на 14-е и 21-е сутки по отношению к 3-м суткам после АТ. Хотя статистически значимых отличий между в уровне M-CSF выявлено не было, надо помнить, что данный фактор продуцируется клетками моноцитарно-макрофагального ряда [14] и активированными Т-клетками [29], и его повышение может быть неблагоприятным с точки зрения выживания аллотрансплантата [22].

Статистически значимый эффект коротких пептидов ТБГ был обнаружен только в отношении IL-2. Его уровень повышался на 14-е сутки после АТ в опытной группе в сравнении с показателями животных контрольной группы. Известно, что IL-2 необходим для оптимального развития, выживания и функционирования Treg. В исследованиях на людях с аутоиммунными заболеваниями или РТПХ показано, что низкая доза IL-2 увеличивает количество эндогенных Treg [21], а использование этого цитокина в комплексе с донор-специфическими Treg приводит к продлению выживания кожного аллотрансплантата [30]. Таким образом, повышение концентрации IL-2 может быть благоприятным фактором, формирующим преимущественно супрессивный ответ на введение аллоантигенов.

Аллотрансплантация приводила к статистически значимому повышению концентрации IL-7 на 14-е и 21-е сутки после начала эксперимента по отношению к значениям интактных животных и по отношению к 3-м суткам, однако введение животным пептидов ТБГ отменяло этот эффект. Статистически значимых отличий между контрольной и опытной группами выявлено не было, однако можно наблюдать тенденцию к снижению уровня этого цитокина начиная с 7-х суток после АТ у животных, которым вводили исследуемые пептиды. IL-7 — это лимфопоэтиче-

ский фактор роста, который относится к короткоцепочечным цитокинам 1-го типа семейства гематопоэтина. IL-7 занимает особое положение среди других цитокинов из-за его уникальной функции в гематопоэзе, не дублирующейся другими факторами [9]. Поскольку IL-7 вовлечен в отторжение аллотрансплантата [32], снижение его концентрации в данном случае может быть благоприятным фактором.

В опытной группе животных наблюдалось достоверное по отношению к интактным крысам увеличение концентрации фактора роста эндотелия (VEGF). Отметим, что в опытной группе животных концентрация этого фактора выше, чем в контрольной на протяжении всего эксперимента. Даже на 21-е сутки после введения клеток КМ под действием пептидов ТБГ уровень VEGF был выше, чем в интактной группе в среднем в 3,5 раза, тогда как в опытной — в 5,5 раза, но статистически значимых отличий между этими группами выявлено не было. VEGF — сигнальный белок, вырабатываемый клетками для стимуляции васкулогенеза и ангиогенеза [12]. Известно, что одной из основных функций ТБГ является ангиогенная, опосредованная через повышение продукции VEGF [16]. Интересно, что пептиды ТБГ в нашем исследовании повышали уровень этого ростового фактора, возможно, в данном случае происходила своего рода имитация эффекта полноразмерной молекулы.

Аллотрансплантация не влияла на уровень хемокинов в сыворотке крови животных. Однако на фоне введения пептидов ТБГ на 3-и сутки происходило статистически значимое повышение уровня таких хемокинов, как MCP-1 и RANTES в сыворотке крови по отношению к контрольной группе. На фоне дальнейшего введения пептидов ТБГ концентрации этих хемокинов в сыворотке крови снижались на 7-е, 14-е и 21-е сутки от начала эксперимента. Интересно, что и при исследовании концентраций хемокинов на 21-е сутки от начала эксперимента тенденция к увеличению их уровня в контрольной группе сменялась на тенденцию к снижению в опытной группе. MCP-1 (CCL-2) и RANTES (CCL-5) относятся к группе CC-хемокинов и являются хемотаксантами макрофагов и Т-лимфоцитов, соответственно [10]. Известно, что они вовлечены в процесс острого и хронического воспаления, в том числе и при развитии иммунного ответа на аллогенный трансплантат [15, 33]. Таким образом, можно предположить, что первое введение пептидов ТБГ усилило воспалительные реакции в ответ на аллоантиген, но последующие введения препарата привели к нормализации уровней этих хемокинов.

Таким образом, пептиды ТБГ являются перспективным препаратом с иммунофармакологическими свойствами и нуждаются в дальнейших исследованиях для установления механизма их действия.

В результате проведенных исследований, мы показали, что пептиды ТБГ способны разнонаправленно модулировать цитокиновый профиль в динамике иммунного ответа на аллотрансплантат. Первые исследования биологической активности тетрапептидных фрагментов ТБГ были проведены Молдогазиевой Н.Т с коллегами (2012). В частности, было показано, что пептиды YECE и YVCE в концентрации 10^{-7} М они способны снижать экспрессию активационного антигена CD95 на поверхности лимфоцитов у больных atopической бронхиальной астмой в 1,4 раза и у больных инфекционно-аллергическим миокардитом в 1,2 раза [2].

Важно отметить, что пептиды другого фетоплацентарного белка, хорионического гонадотропина (ХГ), также изучаются в контексте их иммунофармакологического потенциала [42]. Предполагается, что противовоспалительные эффекты ХГЧ обусловлены пептидами, расположенными в β -субъединице ХГЧ, такими как LQGV, AQGV и LAGV [37]. На модели с использованием экспериментальных животных было показано противовоспалительное действие этих пептидов, которое заключалось в снижении уровня провоспалительных цитокинов [20, 37]. Препарат EA-230 – (синтетический линейный тетрапептид AQGV) в данный момент проходит клинические испытания по изучению фармакокинетики, безопасности и переносимости А-230 у здоровых субъектов, используя различные стратегии введения [38]. В целом, пептиды ХГ перспективны в терапии воспалительных заболеваний, отдельно или в сочетании с другими

противовоспалительными средствами [42]. Другой фетоплацентарный белок – альфа-фетопро-теин (АФП) также имеет потенциал как источник пептидов с терапевтическим эффектом [24, 25]. Помимо этого, довольно подробно изучены иммуномодулирующие эффекты пептидов активного центра GM-CSF, на основе которых создан препарат Ацеграм [1].

Невзирая на активное изучение коротких пептидов различных белков, пока мы не можем считать, что пептиды воспроизводят эффект целой молекулы. Так, наши исследования влияния нативного ТБГ на продукцию цитокинов и хемокинов интактными мононуклеарными клетками в условиях *in vitro* показали, что ТБГ подавлял продукцию IL-6, IL-8, IL-17, IFN γ , TNF α , IL-9, IL-13, G-CSF, GM-CSF, MIP-1 α , MIP-1 β , MCP-1, одновременно стимулируя продукцию VEGF и IL-12 (p70) [4]. В ситуации *in vivo*, пептиды ТБГ индуцировали повышение IFN γ , IL-6, TNF α , IL-4, IL-13, IL-2, M-CSF, MCP-1 и RANTES, однако надо понимать, что повышение происходило на фоне аллогенной трансплантации и в динамике наблюдения их уровень снижался в сравнении с контрольной группой.

Заключение

В целом показано, что применение пептидов ТБГ в процессе развития иммунного ответа на аллотрансплантат ускоряет нормализацию концентраций подавляющего большинства исследованных цитокинов, что свидетельствует об иммунофармакологическом потенциале этих пептидов. Полученные данные могут использоваться для разработки научно обоснованных технологий коррекции дисбаланса иммунитета, особенно для аутоиммунных заболеваний в виде фармакологического препарата на основе исследуемых пептидов.

Список литературы / References

1. Зурочка А.В., Гриценко В.А., Зурочка В.А., Добрынина М.А., Черешнев В.А. Гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (ГМ-КСФ) и его синтетические аналоги: иммунологические эффекты и клиническое применение. Екатеринбург: УрО РАН, 2021. 288 с. [Zurochka A.V., Gritsenko V.A., Zurochka V.A., Dobrynina M.A., Chereshev V.A. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and its synthetic analogues: immunobiological effects and clinical application. 2021]. Yekaterinburg: Ural Branch of the RAS, 2021. 288 p.
2. Молдогазиева Н.Т., Терентьев А.А., Антонов М.Ю., Казимирский А.Н., Шайтан К.В. Корреляция между биологической активностью и конформационно-динамическими свойствами тетра- и пентапептидных фрагментов фетоплацентарных белков // Биохимия, 2012. Т. 77, № 5. С. 583-602. [Moldogazieva N.T., Terentiev A.A., Antonov M.Yu., Kazimirsky A.N., Shaitan K.V. Correlation between biological activity and conformational-dynamic properties of tetra- and pentapeptides derived from fetoplacental proteins. *Biokhimiya = Biochemistry*, 2012, Vol. 77, no. 5, pp. 583-602. (In Russ.)]
3. Посисеева Л.В., Назаров С.Б., Татаринов Ю.С. Трофобласт-специфический бета-гликопротеин в акушерстве и гинекологии. Иваново: Иваново, 2004. 240 с. [Posiseeva L.V., Nazarov S.B., Tatarinov Yu.S. Trophoblast-specific beta-glycoprotein in obstetrics and gynecology]. Ivanovo: Ivanovo Publishing, 2004. 240 p.
4. Раев М.Б., Литвинова Л.С., Юрова К.А., Хазиахматова О.Г., Дунец Н.А., Тимганова В.П., Бочкова М.С., Храмцов П.В., Заморина С.А. Роль трофобластического β 1-гликопротеина в регуляции цитокино-

вого и хемокинового профиля интактных мононуклеарных клеток // Доклады академии наук, 2017. Т. 475, № 3. С. 349-352. [Raev M.B., Litvinova L.S., Yurova K.A., Khaziakhmatova O.G., Dunets N.A., Timganova V.P., Bochkova M.S., Khramtsov P.V., Zamorina S.A. The role of trophoblastic β 1-glycoprotein in the regulation of the cytokine and chemokine profile of intact mononuclear cells. *Doklady akademii nauk = Reports of the Academy of Sciences*, 2017, Vol. 475, no. 3, pp. 349-352. (In Russ.)]

5. Тимганова В.П., Бочкова М.С., Раев М.Б., Храмов П.В., Заморина С.А. Иммунорегуляторный потенциал трофобластического β 1-гликопротеина // Медицинская иммунология, 2021. Т. 23, № 3. С. 455-468. [Timganova V.P., Bochkova M.S., Rayev M.B., Khramtsov P.V., Zamorina S.A. Immunoregulatory potential of pregnancy-specific β 1-glycoprotein. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2021, Vol. 23, no. 3, pp. 455-468. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-IPO-2170.

6. Angell Y., Holford M., Moos W.H. Building on success: a bright future for peptide therapeutics. *Protein. Pept. Lett.*, 2018, Vol. 25, no. 12, pp. 1044-1050.

7. Blois S.M., Sulkowski G., Tirado-González I., Warren J., Freitag N., Klapp B., Rifkin D., Fuss I., Strober W., Dveksler G. Pregnancy-specific glycoprotein 1 (PSG1) activates TGF- β and prevents dextran sodium sulfate (DSS)-induced colitis in mice. *Mucosal Immunol.*, 2014, Vol. 7, pp. 348-358.

8. Boieri M., Shah P., Dressel R., Inngjerdigen M. The role of animal models in the study of hematopoietic stem cell transplantation and GvHD: A historical overview. *Front. Immunol.*, 2016, Vol. 7, 333. doi: 10.3389/fimmu.2016.00333.

9. Chen D., Tang T.-X., Deng H., Yang X.-P., Tang Z.-H. Interleukin-7 Biology and its effects on immune cells: mediator of generation, differentiation, survival, and homeostasis. *Front. Immunol.*, 2021, Vol. 12, 747324. doi: 10.3389/fimmu.2021.747324.

10. Conti P., DiGioacchino M. MCP-1 and RANTES are mediators of acute and chronic inflammation. *Allergy Asthma Proc.*, 2001, Vol. 22, no. 3, pp. 133-137.

11. Davidson C., Verma N.D., Robinson C.M., Plain K.M., Tran G.T., Hodgkinson S.J., Hall B.M. IL-13 prolongs allograft survival: association with inhibition of macrophage cytokine activation. *Transpl. Immunol.*, 2007, Vol. 17, no. 3, pp. 178-186.

12. Duffy A.M., Bouchier-Hayes D.J., Harmey J.H. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and its role in non-endothelial cells: autocrine signalling by VEGF. In: Madame Curie bioscience database [Internet]. Austin (TX): Landes Bioscience, 2000-2013.

13. Falcón C.R., Martínez F.F., Carranza F., Cervi L., Motrán C.C. *In vivo* expression of recombinant pregnancy-specific glycoprotein 1a inhibits the symptoms of collagen-induced arthritis. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 2014, Vol. 72, no. 6, pp. 527-533.

14. Fixe P., Praloran V. M-CSF. Haematopoietic growth factor or inflammatory cytokine. *Cytokine*, 1998, Vol. 10, no. 1, pp. 32-37.

15. Fleury S., Li J., Simeoni E., Fiorini E., von Segesser L.K., Kappenberger L., Vassalli G. Gene transfer of RANTES and MCP-1 chemokine antagonists prolongs cardiac allograft survival. *Gene Ther.*, 2006, Vol. 13, pp. 1104-1109.

16. Ha C.T., Wu J.A., Irmak S., Lisboa F.A., Dizon A.M., Warren J.W., Ergun S., Dveksler G.S. Human pregnancy specific beta-1-glycoprotein 1 (PSG1) has a potential role in placental vascular morphogenesis. *Biol. Reprod.*, 2010, Vol. 83, no. 1, pp. 27-35.

17. Hardt F., Claesson M.H. Graft-versus-host reactions mediated by spleen cells from amyloidotic and nonamyloidotic mice. *Transplantation*, 1971, Vol. 12, no. 1, pp. 36-39.

18. Henden A.S., Hill G.R. Cytokines in graft-versus-host disease. *J. Immunol.*, 2015, Vol. 194, no. 10, pp. 4604-4612.

19. Jones K., Bryant S., Luo J., Kiesler P., Koontz S., Warren J., Malech H., Kang E., Dveksler G. Recombinant pregnancy-specific glycoprotein 1 has a protective role in a murine model of acute graft-versus-host disease. *Biol. Blood Marrow Transplant.*, 2019, Vol. 25, no. 2, pp. 193-203.

20. Khan N.A., Susa D., van den Berg J.W., Huisman M., Ameling M.H., van den Engel S., Roest H.P., IJzermans J.N.M., Dik W.A., Benner R., de Bruin R.W.F. Amelioration of renal ischaemia-reperfusion injury by synthetic oligopeptides related to human chorionic gonadotropin. *Nephrol. Dial. Transplant.*, 2009, Vol. 24, no. 9, pp. 2701-2708.

21. Koreth J., Matsuo K., Kim H.T., McDonough S.M., Bindra B., Alyea E.P. 3rd, Armand P., Cutler C., Ho V.T., Treister N.S., Bienfang D.C., Prasad S., Tzachanis D., Joyce R.M., Avigan D.E., Antin J.H., Ritz J., Soiffer R.J. Interleukin-2 and regulatory T cells in graft-versus-host disease. *N. Engl. J. Med.*, 2011, Vol. 365, no. 22, pp. 2055-2066.

22. Le Meur Y., Leprivey-Lorgeot V., Mons S., José M., Dantal J., Lemauff B., Aldigier J.-C., Leroux-Robert C., Praloran V. Serum levels of macrophage-colony stimulating factor (M-CSF): a marker of kidney allograft rejection. *Nephrol. Dial. Transplant.*, 2004, Vol. 19, Iss. 7, pp. 1862-1865.

23. Liu L., Zhang Z.-C. Short linear motifs (SLiMs): New functionally diverse modules regulating protein-protein interactions. *Prog. Biochem. Biophys.*, 2017, Vol. 44, no. 2, pp. 129-138.

24. Mesfin F.B., Andersen T.T., Jacobson H.I., Zhu S., Bennett J.A. Development of a synthetic cyclized peptide derived from alpha-fetoprotein that prevents the growth of human breast cancer. *J. Pept. Res.*, 2001, Vol. 58, no. 3, pp. 246-256.

25. Mesfin F.B., Bennett J.A., Jacobson H.I., Zhu S., Andersen T.T. Alpha-fetoprotein-derived antiestrogenic octapeptide. *Biochim. Biophys. Acta.*, 2000, Vol. 1501, no. 1, pp. 33-43.

26. Moldogazieva N.T., Mokhosoev I.M., Terentiev A.A. Pregnancy-Specific β 1-Glycoproteins: combined biomarker roles, structure/function relationships and implications for drug design. *Curr. Med. Chem.*, 2017, Vol. 24, no. 3, pp. 245-267.
27. Ogonek J., Juric M.K., Ghimire S., Varanasi P.R., Holler E., Greinix H., Weissinger E. Immune reconstitution after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Front. Immunol.*, 2016. Vol. 7, 507. doi: 10.3389/fimmu.2016.00507.
28. Persico M., Di Dato A., Orteca N., Fattorusso C., Novellino E., Andreoli M., Ferlini C. From protein communication to drug discovery. *Curr. Top. Med. Chem.*, 2015, Vol. 15, no. 20, pp. 2019-2031.
29. Praloran V., Gascan H., Papin S., Chevalier S., Trossaert M., Boursier M.C. Inductible production of macrophage colony stimulating factor (CSF-1) by malignant and normal human T cells. *Leukemia*, 1990, Vol. 4, pp. 411-414.
30. Ratnasothy K., Jacob J., Tung S., Boardman D., Lechler R.I., Sanchez-Fueyo A., Martinez-Llordella M., Lombardi G. IL-2 therapy preferentially expands adoptively transferred donor-specific Tregs improving skin allograft survival. *Am. J. Transplant.*, 2019, Vol. 19, no. 7, pp. 2092-2100.
31. Ryan A.J., Squires S., Strutt H.L., Johnson R.T. Camptothecin cytotoxicity in mammalian cells is associated with the induction of persistent double strand breaks in replicating DNA. *Nucleic. Acids Res.*, 1991, Vol. 19, no. 12, pp. 3295-3300.
32. Schreiber M., Weigelt M., Karasinsky A., Anastasiadis K., Schallenberg S., Petzold C., Bonifacio E., Kretschmer K., Hommel A. Inducible IL-7 hyperexpression influences lymphocyte homeostasis and function and increases allograft rejection. *Front. Immunol.*, 2019, Vol. 10, 742. doi: 10.3389/fimmu.2019.00742.
33. Sekine Y., Yasufuku K., Heidler K.M., Cummings O.W., van Rooijen N., Fujisawa T., Brown J., Wilkes D.S. Monocyte chemoattractant protein-1 and RANTES are chemotactic for graft infiltrating lymphocytes during acute lung allograft rejection. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.*, 2000, Vol. 23, no. 6, pp. 719-726.
34. Striz I. Cytokines of the IL-1 family: recognized targets in chronic inflammation underrated in organ transplantations. *Clin. Sci.*, 2017, Vol. 131, no. 17, pp. 2241-2256.
35. Sun K., Li M., Sayers T.J., Welniak L.A., Murphy W.J. Differential effects of donor T-cell cytokines on outcome with continuous bortezomib administration after allogeneic bone marrow transplantation. *Blood*, 2008, Vol. 112, no. 4, pp. 1522-1529.
36. Turner M.D., Nedjai B., Hurst T., Pennington D.J. Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. *Biochim. Biophys. Acta.*, 2014, Vol. 43, no. 11, pp. 2563-2582.
37. van den Berg H.R., Khan N.A., van der Zee M., Bonthuis F., IJzermans J.N., Dik W.A., Boardman D., Lechler R.I., Sanchez-Fueyo A., Martinez-Llordella M., Lombardi G. Synthetic oligopeptides related to the β -Subunit of human chorionic gonadotropin attenuate inflammation and liver damage after (trauma) hemorrhagic shock and resuscitation. *Shock*, 2009, Vol. 31, no. 3, pp. 285-291.
38. van Groenendaal R., Beunders R., Hofland J., Morshuis W.J., Kox M., van Eijk L.T., Pickkers P. The safety, tolerability, and effects on the systemic inflammatory response and renal function of the human chorionic gonadotropin hormone-derivative EA-230 following on-pump cardiac surgery (The EASI Study): protocol for a randomized, double-blind, placebo-controlled phase 2 Study. *JMIR Res. Protoc.*, 2019, Vol. 8, no. 2, e11441. doi: 10.2196/11441.
39. Vogelsang G.B., Hess A.D., Friedman K.J., Santos G.W. Therapy of chronic Graft-v-Host disease in a rat model. *Blood*, 1989, Vol. 74, Iss. 1, pp. 507-511. doi: 10.1182/blood.V74.1.507.507.
40. Weigt S.S., Palchevskiy V., Belperio J.A. Inflammasomes and IL-1 biology in the pathogenesis of allograft dysfunction. *J. Clin. Invest.*, 2017, Vol. 127, no. 6, pp. 2022-2029.
41. Wu J., Xie A., Chen W. Cytokine regulation of immune tolerance. *Burns Trauma*, 2014, Vol. 2, no. 1, pp. 11-17.
42. Yoo S.K., Mehdi S.F., Pusapati S., Mathur N., Anipindi M., Lunenfeld B., Lowell B., Yang H., Metz C.N., Khan S.A., Leroith D., Roth J. Human chorionic gonadotropin and related peptides: candidate anti-inflammatory therapy in early stages of sepsis. *Front. Immunol.*, 2021, Vol. 12, 714177. doi: 10.3389/fimmu.2021.714177.
43. Yue X.T., Wei X.X., Jia W.H., Mao H., Chen W.R., Gu H.H., Wu J.Q., Li D.P., Xu K.L., Huang Y.H. Effects of regulatory dendritic cells on graft-versus-host disease and graft-versus-leukemia in mice after allogeneic bone marrow transplantation. *Int. J. Clin. Exp.*, 2018, Vol. 11, no. 8, pp. 7800-7810.

Авторы:

Тимганова В.П. — к.б.н., научный сотрудник лаборатории экологической иммунологии ФГБУН «Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук», г. Пермь, Россия

Бочкова М.С. — к.б.н., научный сотрудник лаборатории экологической иммунологии ФГБУН «Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук»; старший преподаватель кафедры микробиологии и иммунологии ФГБОУ ВО «Пермский государственный национальный исследовательский университет», г. Пермь, Россия

Authors:

Timganova V.P., PhD (Biology), Research Associate, Laboratory of Ecological Immunology, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation

Bochkova M.S., PhD (Biology), Research Associate, Laboratory of Ecological Immunology, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch, Russian Academy of Sciences; Senior Lecturer, Department of Microbiology and Immunology, Perm State National Research University, Perm, Russian Federation

Шардина К.Ю. — младший научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии ФГБУН «Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук», г. Пермь, Россия

Узвйук С.В. — младший научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии ФГБУН «Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук», г. Пермь, Россия

Гутина Е.В. — студентка кафедры микробиологии и иммунологии ФГБОУ ВО «Пермский государственный национальный исследовательский университет», г. Пермь, Россия

Раев М.Б. — д.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории экологической иммунологии ФГБУН «Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук»; профессор кафедры микробиологии и иммунологии ФГБОУ ВО «Пермский государственный национальный исследовательский университет», г. Пермь, Россия

Любимов А.В. — научный руководитель лаборатории токсикологических исследований департамента фармакологии, Университет Иллинойса, Чикаго, США

Заморина С.А. — д.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории экологической иммунологии ФГБУН «Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук»; профессор кафедры микробиологии и иммунологии ФГБОУ ВО «Пермский государственный национальный исследовательский университет», г. Пермь, Россия

Shardina K. Yu., Junior Research Associate, Laboratory of Molecular Immunology, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation

Uzhviyuk S. V., Junior Research Associate, Laboratory of Molecular Immunology, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation

Gutina E. V., Student, Department of Microbiology and Immunology, Perm State National Research University, Perm, Russian Federation

Rayev M. B., PhD, MD (Biology), Leading Research Associate, Laboratory of Ecological Immunology, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch, Russian Academy of Sciences; Professor, Department of Microbiology and Immunology, Perm State National Research University, Perm, Russian Federation

Lyubimov A. V., Director for Research, Toxicology Laboratory, Department of Pharmacology, University of Illinois, Chicago, USA

Zamorina S. A., PhD, MD (Biology), Leading Research Associate, Laboratory of Ecological Immunology, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch, Russian Academy of Sciences; Professor, Department of Microbiology and Immunology, Perm State National Research University, Perm, Russian Federation

Поступила 27.12.2021
Отправлена на доработку 13.02.2022
Принята к печати 18.02.2022

Received 27.12.2021
Revision received 13.02.2022
Accepted 18.02.2022

ИММУННЫЙ ФЕНОТИП ТКАНЕЙ ЭКССУДАТИВНЫХ ПОРАЖЕНИЙ ПРОСТРАНСТВА РЕЙНКЕ

Ковалев М.А.¹, Давыдова Е.В.², Зурочка А.В.^{3,4}

¹ Филиал № 3 ФГБУЗ «3 Центральный военный клинический госпиталь имени А.А. Вишневского», г. Одинцово, Московская обл., Россия

² ГБУЗ «Челябинская областная клиническая больница», г. Челябинск, Россия

³ ФГАОУ ВО «Южно-Уральский государственный университет (Национальный исследовательский университет)», г. Челябинск, Россия

⁴ ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук, г. Екатеринбург, Россия

Резюме. Экссудативные поражения пространства Рейнке невоспалительной природы являются самой частой причиной нарушений фонации у представителей вокальных профессий. Ведущую роль в патогенезе данной патологии играет практически полное отсутствие лимфатического дренажа в пространстве Рейнке и локальное накопление тканевой жидкости. Особое значение в механизмах прогрессирования патологии придается состоянию мукозо-ассоциированной ткани региона гортани. Цель работы – оценить показатели иммуногистохимического типирования лимфоцитов при экссудативных поражениях пространства Рейнке.

Основную группу составили 40 пациентов, среднего возраста $43,2 \pm 2,1$ года с опухолеподобными экссудативными поражениями пространства Рейнке. Материалом для исследования служил биопсийный материал голосовых складок: полипы, голосовые узелки и отек Рейнке. Среди полипов отдельно выделяли миксоидный и ангиоматозный типы. Видеофибrolарингоскопия проводилась с помощью бронхофиброскопа Olympus TYPE 150 (Германия). Морфологические исследования проводили на микропрепаратах DMRXA (Leica, Германия) с использованием компьютерной программы ImageScopeM (Германия). Стандартно подготовленные срезы окрашивали гематоксилином и эозином (Biovitrum, Россия). Иммуногистохимическая оценка содержания основных популяций Т-лимфоцитов (CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺), В-лимфоцитов (CD20⁺), гистиоцитов (CD68⁺), а клеток с экспрессией регуляторов клеточного обновления bcl-2 и p53 проводилась в автоматическом режиме на иммуногистостейнере BenchMarkXT (Ventana, США). Результат выражали в ед/мм².

Выявлены особенности иммунофенотипа экссудативных поражений пространства Рейнке. При отеке Рейнке отмечалось высокое содержание CD3⁺ лимфоцитов, CD4⁺, CD8⁺, CD20⁺, p53-позитивных клеток базального эпителия, низкое содержание CD68⁺, bcl-2-позитивных лимфоцитов и клеток базального эпителия. Миксоидный тип полипов характеризовался низким содержанием лимфоцитов CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD20⁺, bcl-2-позитивных лимфоцитов и клеток базального эпителия, клеток моноцитарно-макрофагального ряда CD68⁺, высоким содержанием p53-позитивных клеток базального эпителия. При ангиоматозном типе полипов зафиксировано низкое содержание лимфоцитов CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD20⁺, высокое содержание клеток моноцитарно-макрофагального ряда CD68⁺, MMP-9⁺, bcl-2-позитивных лимфоцитов и низкое содержание p53-позитивных клеток базального эпителия. Ткани голосовых узелков характеризовались низким содержанием лимфоцитов CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺,

Адрес для переписки:

Давыдова Евгения Валерьевна
ГБУЗ «Челябинская областная клиническая больница»
454048, Россия, г. Челябинск, ул. Воровского, 70.
Тел.: 8 (351) 232-73-71.
E-mail: davidova-ev.med@yandex.ru

Address for correspondence:

Davydova Evgeniya V.
Chelyabinsk Regional Clinical Hospital
454048, Russian Federation, Chelyabinsk, Vorovsky str., 70.
Phone: 7 (351) 232-73-71.
E-mail: davidova-ev.med@yandex.ru

Образец цитирования:

М.А. Ковалев, Е.В. Давыдова, А.В. Зурочка «Иммунный фенотип тканей экссудативных поражений пространства Рейнке» // Медицинская иммунология, 2022. Т. 24, № 3. С. 507-518.
doi: 10.15789/1563-0625-IPO-2483
© Ковалев М.А. и соавт., 2022

For citation:

M.A. Kovalev, E.V. Davydova, A.V. Zurochka "Immune phenotype of tissues from exudative lesions of Reinke's space", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2022, Vol. 24, no. 3, pp. 507-518.
doi: 10.15789/1563-0625-IPO-2483
DOI: 10.15789/1563-0625-IPO-2483

CD20⁺ и p53-позитивных клеток базального эпителия; высоким содержанием клеток моноцитарно-макрофагального ряда CD68⁺, MMP-9⁺ и bcl-2-позитивных лимфоцитов.

Ключевые слова: экссудативные поражения пространства Рейнке, лимфоциты, типирование

IMMUNE PHENOTYPE OF TISSUES FROM EXUDATIVE LESIONS OF REINKE'S SPACE

Kovalev M.A.^a, Davydova E.V.^b, Zurochka A.V.^{c, d}

^a A. Vishnevsky 3rd Central Military Clinical Hospital (3rd Branch), Odintsovo, Moscow Region, Russian Federation

^b Chelyabinsk Regional Clinical Hospital, Chelyabinsk, Russian Federation

^c South Ural State University (National Research University), Chelyabinsk, Russian Federation

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

Abstract. Non-inflammatory exudative lesions of Reinke's space present the most common cause of phonation disorders in representatives of vocal professions. The leading role in pathogenesis of this disorder is given to the nearly complete absence of lymphatic drainage of Reinke space and local deposition of tissue fluid. The mechanisms of its progression are of particular importance when determining the condition of mucosa-associated laryngeal tissue. The aim of our work was to evaluate the parameters of immunohistochemical lymphocyte typing in exudative lesions from the Reinke's space. Materials and methods: The main group consisted of 40 patients, at the mean age of 43.2±2.1 years, exhibiting tumor-like exudative lesions of Reinke's space. The biopsy material was taken from the vocal folds, including polyps, vocal nodules and Reinke's edema. Myxoid and angiomatous types of the polyps were separately assessed. Videofibrolaryngoscopy was performed using an Olympus TYPE 150 bronchofibroscope (Germany). Morphological studies were carried out using a DMRXA microscope (Leika, Germany) by means of the ImageScopeM computer program (Germany). The uniformly treated sections were stained with Hematoxylin & Eosin (Biovitrum, Russia). Immunohistochemical quantitative assessment of the main T cell populations (CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺), B cells (CD20⁺), histiocytes (CD68⁺), and the cells expressing bcl-2 and p53 cell regulators was carried out automatically using the BenchMarkXT immunohistotainer (Ventana, USA). The results were expressed as U/mm². Results and Discussion. Some special features of cellular immunophenotype were revealed in exudative lesions of Reinke's space. Reinke's edema was characterized by high content of CD3⁺ lymphocytes, CD4⁺, CD8⁺, CD20⁺, p53 positive cells of the basal epithelium, as well as low numbers of CD68⁺, bcl-2 positive lymphocytes and cells of the basal epithelium. Myxoid type of polyps was characterized by low content of CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD20⁺ lymphocytes, bcl-2 positive lymphocytes and basal epithelium cells, CD68⁺ monocyte-macrophage cells, and high amounts of p53 positive basal epithelial cells. In the angioma-type polyps, we have registered low contents of CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD20⁺ lymphocytes, high numbers of monocyte-macrophage CD68⁺ cells, MMP-9⁺, bcl-2 positive lymphocytes, and low content of p53 positive cells of basal epithelium. The samples from the vocal nodules were characterized by low content of CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD20⁺ and p53 positive basal epithelial cells; high numbers of CD68⁺ cells (monocyte-macrophage series), MMP-9⁺ and bcl-2 positive lymphocytes.

Keywords: exudative lesions, Reinke's space, lymphocytes, typing

Работа выполнена в рамках НИР лаборатории иммунологии воспаления Института иммунологии и физиологии Уральского отделения Российской академии наук (г. Екатеринбург): Иммунофизиологические и патофизиологические механизмы регуляции и коррекции функций организма № гос. регистрации 122020900136-4.

Введение

Распространенность доброкачественных опухолеподобных новообразований гортани достаточно высока и составляет 50-75% случаев среди невоспалительной продуктивной патологии гортани [4, 7, 15]. Экссудативные доброкачественные поражения пространства Рейнке относятся

к одной из разновидностей опухолеподобных новообразований гортани, включают отек Рейнке, голосовые узелки, полипы голосовых складок и являются самой частой причиной нарушений голоса [4, 15]. По мнению ряда авторов, отсутствие своевременного лечения может приводить к малигнизации новообразований в 3-9% случаев [9]. Среди всех экссудативных поражений пространства Рейнке (ЭППР) полипы голосовых складок, по данным различных авторов, встречаются в 40-69%, отек Рейнке в 5-7%, голосовые узелки в 10-24 % [3, 25, 27]. Полипы обычно диагностируют у мужчин среднего возраста, чаще после 30-40 лет, могут встречаться и в подростковом возрасте, располагаются на желудочковой поверхности одной или двух голосовых складок [3, 15, 21, 23, 27]. Узелки голосовых складок (синонимы: певческие, ларингеальные узелки, нодозный хордит) развиваются, как правило, симметрично, на медиальной поверхности передней или средней трети обеих истинных голосовых складок, процесс чаще встречается у молодых женщин, имеющих длительные и интенсивные голосовые нагрузки [2, 4]. Отек Рейнке (синонимы: хроническая отечная дегенерация, полиповидная дегенерация голосовых складок, хроническая отечная гипертрофия) хроническое диффузное, чаще двустороннее отечное набухание мембранозной части голосовых складок. Ведущую роль в патогенезе ЭППР играет практически полное отсутствие лимфатического дренажа в пространстве Рейнке, локальное накопление жидкости с последующим ремоделированием тканей голосовых складок. К основным причинам развития ЭППР относят повышенные голосовые нагрузки, фонотравму, кроме того, в силу анатомо-физиологических особенностей гортань подвергается действию большого количества ингаляционных агрессивных ирритантов, включая аллоантигены, токсичные компоненты табачного дыма, кислое содержимое желудка при ГЭРБ и природных поллютантов [8, 14, 17]. Этиологические факторы приводят к микротравмам слизистой голосовых складок, тканевому отеку, гипоксически-ишемическим изменениям, формированию опухолевидных новообразований, появлению кровоизлияний, ангиоматоза, фиброзирования с последующей дегенерацией.

Мукозо-ассоциированная лимфоидная ткань региона гортани при формировании ЭППР имеет повышенную васкуляризацию, с большим количеством расширенных с истонченными стенками капилляров, отличающихся высокой ломкостью.

Иммунные клетки МALT гортани принимают активное участие в реакциях иммунного реагирования при формировании различной патологии голосовых складок.

Цель работы — оценить показатели иммуногистохимического типирования лимфоцитов при экссудативных поражениях пространства Рейнке.

Материалы и методы

Дизайн исследования

Исследование проведено на базе оториноларингологических отделений ГБУЗ «Челябинская областная клиническая больница» (г. Челябинск) и Филиала №3 ФГБУ «3 Центральный Военный Клинический Госпиталь им. А.А. Вишневского» Минобороны РФ (г. Одинцово).

Основную группу составили 40 пациентов, среднего возраста $43,2 \pm 2,1$ года с опухолеподобными ЭППР: полипы голосовых складок, голосовые узелки, отек Рейнке, которые поступали для оперативного лечения. Диагноз выставлялся согласно МКБ-10 (J38.1 Полип голосовой складки и гортани). Большинство пациентов предъявляли жалобы на осиплость голоса, приступообразный непродуктивный кашель, явления дисфонии, ощущение «инородного тела», «кома» в горле, сухость и першение. Средняя длительность заболевания составляла $4,5 \pm 1,2$ года. Частота рецидивов в среднем 2-3 раза в год. Материалом для исследования служил биопсийный материал новообразований. По результатам гистологического исследования выделено 4 группы: из числа полипов голосовых складок ($n = 19$) в 1-ю группу вошли 10 образцов тканей с ангиоматозным типом полипов, во 2-ю группу — 9 полипов миксоидного типа, 3-ю группу составили — узелки голосовых складок ($n = 7$), 4-ю группу — образцы с отеком Рейнке ($n = 14$).

Видеофибrolарингоскопия проводилась с помощью фибробронхоскопа Olympus TYPE150 (Германия) с визуализацией на широкоформатном мониторе. Осматривали отделы гортани, морганиевы карманы, подголосовой отдел, верхнюю треть трахеи.

Морфологические и иммуногистохимические методы исследования

Забор материала для исследований производили интраоперационно. Стандартно подготовленные срезы окрашивали гематоксилином и эозином (Biovitrum, Россия). Микроскопические исследования проводили на микроскопе DMRXA (Leika, Германия) с использованием компьютерной программы ImageScoreM (Германия). Им-

муногистохимический анализ проводился в автоматическом режиме на иммуногистостейнере BenchMarkXT (Ventana, США) с соблюдением протокола исследования. Оценивали экспрессию моноклональных антител к Т-лимфоцитам (CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺), В-лимфоцитам (CD20⁺), гистиоцитам (CD68⁺), а также регулятору клеточного обновления (bcl-2) и проапоптогенному фактору (p53) в тканях ЭППРс помощью набора специфических антител: к рецептору CD3 (клон 2GV6), к CD4 (клон SP35), к CD8 (клон SP57), к CD20 (клон L26), к CD68 (клон Kp-1), к белку bcl-2 (клон 124), к регулятору клеточного цикла p53 (клон Bp53-11). Для визуализации применяли универсальную систему UltraViewUniversalDAB (Ventana, США). Подсчет клеточных элементов производился под увеличением $\times 400$ с мембранной экспрессией CD3, CD4, CD8, CD20, цитоплазматической экспрессией CD68, bcl-2 и ядерной экспрессией p53 от светло- до темно-коричневого окрашивания на 1 мм² среза ткани. 1 мм² соответствовал трем случайно отобранным полям зрения микроскопа с увеличением объектива $\times 400$ при диаметре поля зрения 0,65 мм и площади 1 поля зрения равной 0,3318 мм² (по формуле определения площади круга через диаметр). Результат выражали в ед/мм².

Статистическая обработка проводилась 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 непараметрический критерий Манна—Уитни, с учетом поправки Бонферрони, значимыми считали различия при $p \leq 0,02$. Для оценки значимости различий между выборочными значениями по частоте встречаемости признака двух и более выборок использовали точный критерий Фишера.

Результаты

Все разновидности ЭППР имели свои клинические и морфологические особенности и схожую гистологическую структуру, обусловленную строением пространства Рейнке. Отек Рейнке, или полиповидная дегенерация голосовых складок при фиброларингоскопии, выглядит симметричным отеком по всему длиннику складки, с полиповидными образованиями, исходящими из мембранозной части голосовых складок, с хорошо выраженным сосудистым рисунком (рис. 1, см. 2-ю стр. обложки).

Полипы чаще образуются на одной из голосовых складок (рис. 2, см. 2-ю стр. обложки), в виде мягко-эластичного образования, студенистой консистенции, красного или ярко-розового цвета, размерами до 1 см, с просвечивающими сосудами, расположенными на широком основании либо на тонкой ножке.

Голосовые узелки имеют вид отечных возвышений, веретенообразной формы, небольших до 2 мм размеров (рис. 3, см. 2-ю стр. обложки).

Иммуногистохимическое типирование лимфоидных клеток в образцах морфологически неоднородных опухолеподобных образований голосовых складок показало ряд значимых различий в содержании отдельных популяций Т- и В-лимфоцитов и субпопуляций Т-лимфоцитов (табл. 1). Ткани полипов при отеке Рейнке содержали наибольшее количество лимфоидных клеток (CD3⁺ лимфоцитов, CD4⁺, CD8⁺, CD20⁺), расположенных преимущественно субэпителиально, при этом численность клеток моноцитарно-макрофагального ряда (CD68⁺), при данной патологии гортани оказалась минимальной. При ангиоматозном, миксоидном типах полипов и голосовых узелках число популяций Т- и В-лимфоцитов и основных субпопуляций Т-лимфоцитов в тканях не имело значимых различий, что, вероятно, обусловлено принадлежностью к одной клинико-морфологической группе и общностью патогенеза. Ведущим компонентом патогенеза всех экссудативных поражений голосовых складок являются расстройства микроциркуляции в пространстве Рейнке с развитием лимфостаза и интерстициального отека, а специфичность поражений обусловлена типичным расположением на голосовых складках: отек Рейнке — на мембранозной части, полипы — на желудочковой части, голосовые узелки — на медиальной поверхности. Примечательно, что ни в одном из представленных образцов ЭППР не обнаружено признаков воспалительной реакции, характер экссудата серозный. Клетки моноцитарно-макрофагального ряда, экспрессирующие CD68⁺, при всех разновидностях ЭППР располагались как интраэпителиально, так и субэпителиально, преимущественно очаговыми скоплениями, наибольшее их количество зафиксировано при ангиоматозном типе и тканях голосовых узелков. Максимальное количество клеток эндотелия, эпителия базальных мембран, фибробластов, экспрессирующих ММР-9 также зафиксировано при ангиоматозном типе полипов и тканях голосовых узелков, которые по гистологической структуре представляют ангиоматозно-фиброзные образования, что свидетельствует

о процессах ремоделирования соединительнотканного матрикса, базальных мембран эпителия и эндотелия микрососудов.

В формировании опухолеподобных ЭППР вносит определенный вклад дисбаланс регуляторов клеточного обновления. Нами изучена частота встречаемости и цитоплазматическая экспрессия регуляторов апоптоза p53 и bcl-2 в лимфоцитах и клетках базального эпителия в образцах ЭППР. Сравнение частоты встречаемости позитивных по наличию экспрессии регулятора апоптоза p53 лимфоцитов при разных видах ЭППР показало отсутствие значимых различий между данными группами (табл. 2).

Значимо большее количество p53-позитивных образцов тканей с экспрессией маркера в клетках базального эпителия отмечено при миксоидном типе полипов и отеке Рейнке в сравнении с ангиоматозным типом полипов и голосовыми узелками (табл. 3). Известно, что уровень экспрессии и активность белка p53 не ограничивается проапоптогенными свойствами последнего, а способствует также изменению настройки клеточного метаболизма, регуляции активности антиоксидантных систем, более экономному расходованию ресурсов энергии [6]. Можно предположить, что значительные нарушения микроциркуляции, более выраженные при миксоидном типе полипов и отеке Рейнке, приводят к усилению экспрессии проапоптогенных факторов, в том числе и в клетках базального эпителия, испытывающих наибольшую гипоксически-ишемическую нагрузку.

Исследование частоты встречаемости образцов, позитивных по экспрессии антиапоптогенного белка bcl-2 лимфоцитов, не показало значимых различий между изучаемыми ЭППР (табл. 4).

В образцах полипов миксоидного типа и при отеке Рейнке обнаружено значимо меньше позитивных по экспрессии bcl-2 клеток базального эпителия, что может отражать готовность данных клеток к реализации апоптогенных сигналов (табл. 5).

Исследование содержания регуляторов апоптоза на единицу площади ткани (мм²) в позитивных по наличию экспрессии bcl-2 и p53 образцах различных морфологических типов ЭППР показало снижение содержания bcl-2⁺ лимфоцитов при миксоидном типе полипов и отеке Рейнке в сравнении с ангиоматозным типом полипов и тканями голосовых узелков (табл. 6). В то время как максимальное количество bcl-2⁺ клеток базального эпителия зафиксировано в тканях голосовых узелков в сравнении с другими изучаемыми ЭППР. Подсчет количества позитивных

по экспрессии p53 лимфоцитов не показал значимых различий между группами. Однако число p53-позитивных клеток базального эпителия при миксоидном типе и максимально отеке Рейнке на единицу площади ткани значимо превышало аналогичные показатели при ангиоматозном типе полипов и тканях голосовых узелков.

Таким образом, иммунофенотип опухолеподобных ЭППР имеет следующие особенности:

- отек Рейнке: высокое содержание CD3⁺ лимфоцитов, CD4⁺, CD8⁺, CD20⁺; низкое содержание CD68⁺; высокое содержание p53-позитивных клеток базального эпителия; низкое содержание bcl-2-позитивных лимфоцитов и клеток базального эпителия;

- миксоидный тип полипов: низкое содержание лимфоцитов CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD20⁺, клеток моноцитарно — макрофагального ряда CD68⁺; высокое содержание p53-позитивных клеток базального эпителия; низкое содержание bcl-2-позитивных лимфоцитов и клеток базального эпителия;

- ангиоматозный тип полипов: низкое содержание лимфоцитов CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD20⁺; высокое содержание клеток моноцитарно-макрофагального ряда CD68⁺; MMP-9⁺; низкое содержание p53-позитивных клеток базального эпителия; высокое содержание bcl-2-позитивных лимфоцитов;

- голосовые узелки: низкое содержание лимфоцитов CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD20⁺; высокое содержание клеток моноцитарно-макрофагального ряда CD68⁺, MMP-9⁺; низкое содержание p53-позитивных клеток базального эпителия; высокое содержание bcl-2-позитивных лимфоцитов.

Обсуждение

Мукозо-ассоциированная лимфоидная ткань (МАЛТ) верхних дыхательных путей активно участвует в реакциях иммунного реагирования [1, 5, 11, 16, 24]. Согласно концепции единства дискретно расположенных анатомических отделов МАЛТ, регион гортани содержит гортань-ассоциированную лимфоидную ткань — LALT (Larynx-Associated Lymphoid Tissue) [19], компоненты которой достаточно автономны по отношению к системным проявлениям иммунных процессов. Нами показано, что слизистая оболочка голосовых складок снабжена определенным количеством иммунных клеток и имеет характерные особенности в зависимости от гистологической структуры ЭППР. Ряд исследований постулирует, что МАЛТ гортани содержит как лимфоциты основных субпопуляций,

ТАБЛИЦА 1. СОДЕРЖАНИЕ ОТДЕЛЬНЫХ СУБПОПУЛЯЦИЙ ИММУННЫХ КЛЕТОК И КЛЕТОК С ЭКСПРЕССИЕЙ MMP-9 В ТКАНЯХ ОПУХОЛЕПОДОБНЫХ ОБРАЗОВАНИЙ ГОЛОСОВЫХ СКЛАДОВ, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 1. CONTENT OF INDIVIDUAL SUBPOPULATIONS OF IMMUNE CELLS AND CELLS WITH THE EXPRESSION OF MMP-9 IN THE TISSUES OF TUMOR-LIKE FORMATIONS OF THE VOCAL FOLDS, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

Показатель, ед/мм ² Index, units/mm ²	Гистологическая структура ткани полипа Histological structure of polyp tissue			
	Полипы голосовых складок Vocal cord polyps		Группа 3 Узелки голосовых складок Group 3 Nodules of the vocal folds (n = 7)	Группа 4 Отек Рейнке Group 4 Reinke's edema (n = 14)
	Группа 1 Ангиоматозный тип Group 1 Angiomatous type (n = 10)	Группа 2 Миксоидный тип Group 2 Mixoid type (n = 9)		
CD3⁺ лимфоциты CD3 ⁺ lymphocytes	38,3 (34,6-40,1)*	34,6 (29,6-37,8)*	28,6 (24,60-32,60)*	204,4 (187,3-211,3)
CD4⁺ лимфоциты CD4 ⁺ lymphocytes	28,6 (22,5-30,4)*	30,2 (26,8-33,2)*	24,3 (22,5-28,8)*	117,2 (103,6-122,4)
CD8⁺ лимфоциты CD8 ⁺ lymphocytes	15,6 (13,2-16,1)*	14,7 (12,3-16,5)*	12,2 (10,5-14,6)*	89,4 (84,6-99,7)
CD20⁺ лимфоциты CD20 ⁺ lymphocytes	8,2 (6,8-10,4)*	10,6 (9,4-12,3)*	13,0 (8,8-15,8)*	24,3 (22,8-30,5)
CD68⁺ лимфоциты CD68 ⁺ lymphocytes	76,5 (72,3-80,1)	18,6 (12,5-22,1)#	128,5 (112,3-136,9)	16,3 (14,8-21,5)#
MMP-9⁺ лимфоциты MMP-9 ⁺ lymphocytes	29,1 (24,8-33,9)	13,6 (11,8-16,6)#	58,9 (52,3-68,8)	17,3 (14,4-19,5)#

Примечание. * – значимые согласно критерию Манна–Уитни ($p \leq 0,02$) различия с группой 4; # - с группами 1 и 3.

Note. *, significant according to the Mann–Whitney test ($p \leq 0.02$) differences with group 4; #- with groups 1 and 3.

ТАБЛИЦА 2. РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ОБРАЗЦОВ ТКАНЕЙ ПО НАЛИЧИЮ ЛИМФОЦИТАРНОЙ ЭКСПРЕССИИ p53 ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ЭППР

TABLE 2. DISTRIBUTION OF TISSUE SAMPLES BY THE PRESENCE OF LYMPHOCYTE EXPRESSION OF p53 IN VARIOUS EXUDATIVE LESIONS OF REINKE'S SPACE

Наличие лимфоцитов с экспрессией p53 Availability lymphocytes with p53 expression	Гистологическая структура ткани полипа Histological structure of polyp tissue			
	Полипы голосовых складок Vocal cord polyps		Группа 3 Узелки голосовых складок Group 3 Nodules of the vocal folds (n = 7)	Группа 4 Отек Рейнке Group 4 Reinke's edema (n = 14)
	Группа 1 Ангиоматозный тип Group 1 Angiomatous type (n = 10)	Группа 2 Миксоидный тип Group 2 Mixoid type (n = 9)		
Позитивная экспрессия Positive expression	6 (60%)	5 (55,5%)	4 (57,1%)	9 (64,2%)
Негативная экспрессия Negative expression	4 (40%)	4 (44,5%)	3 (42,9%)	5 (35,8%)
Точный критерий Фишера, p Fisher exact, p		0,6	0,6	0,5

Примечание. Для сравнения использовали точный критерий Фишера ($p \leq 0,05$).

Note. For comparison, Fisher's exact test was used ($p \leq 0.05$).

ТАБЛИЦА 3. РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ОБРАЗЦОВ ТКАНЕЙ ПО НАЛИЧИЮ ЭКСПРЕССИИ p53 В КЛЕТКАХ БАЗАЛЬНОГО ЭПИТЕЛИЯ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ МОРФОЛОГИЧЕСКОГО ТИПА ЭППР

TABLE 3. DISTRIBUTION OF TISSUE SAMPLES BY THE PRESENCE OF P53 EXPRESSION IN BASAL EPITHELIAL CELLS DEPENDING ON THE MORPHOLOGICAL TYPE OF THE REINKE'S SPACE

Наличие клеток базального эпителия с экспрессией p53 Presence of basal epithelial cells expressing p53	Гистологическая структура ткани полипа Histological structure of polyp tissue			
	Полипы голосовых складок Vocal cord polyps		Группа 3 Узелки голосовых складок Group 3 Nodules of the vocal folds (n = 7)	Группа 4 Отек Рейнке Group 4 Reinke's edema (n = 14)
	Группа 1 Ангиоматозный тип Group 1 Angiomatous type (n = 10)	Группа 2 Миксоидный тип Group 2 Mixoid type (n = 9)		
Позитивная экспрессия Positive expression	4 (40,%)	8 (88,8%)	5 (71,4%)	12 (85,7%)
Негативная экспрессия Negative expression	6 (60%)	1 (11,1%)	2 (28,6%)	2 (14,3%)
Точный критерий Фишера, p Fisher exact, p		0,03	0,6	0,02

Примечание. См. примечание к таблице 2.

Note. As for Table 2.

ТАБЛИЦА 4. РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ОБРАЗЦОВ ТКАНЕЙ ПО НАЛИЧИЮ ЛИМФОЦИТАРНОЙ ЭКСПРЕССИИ bcl-2 ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ЭППР

TABLE 4. DISTRIBUTION OF TISSUE SAMPLES BY THE PRESENCE OF bcl-2 LYMPHOCYTIC EXPRESSION IN VARIOUS OF THE REINKE'S SPACE

Наличие лимфоцитов с экспрессией bcl-2 Presence of lymphocytes expressing bcl-2	Гистологическая структура ткани полипа Histological structure of polyp tissue			
	Полипы голосовых складок Vocal cord polyps		Группа 3 Узелки голосовых складок Group 3 Nodules of the vocal folds (n = 7)	Группа 4 Отек Рейнке Group 4 Reinke's edema (n = 14)
	Группа 1 Ангиоматозный тип Group 1 Angiomatous type (n = 10)	Группа 2 Миксоидный тип Group 2 Mixoid type (n = 9)		
Позитивная экспрессия Positive expression	5 (50%)	6 (66,6%)	3 (42,9%)	8 (57,1%)
Негативная экспрессия Negative expression	5 (50%)	3 (33,4%)	4 (57,1%)	6 (42,9%)
Точный критерий Фишера, p Fisher exact, p		0,4	0,6	0,5

Примечание. См. примечание к таблице 2.

Note. As for Table 2.

ТАБЛИЦА 5. РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ОБРАЗЦОВ ТКАНЕЙ ПО НАЛИЧИЮ ЭКСПРЕССИИ bcl-2 В КЛЕТКАХ БАЗАЛЬНОГО ЭПИТЕЛИЯ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ МОРФОЛОГИЧЕСКОГО ТИПА ЭППР

TABLE 5. DISTRIBUTION OF TISSUE SAMPLES BY THE PRESENCE OF bcl-2 EXPRESSION IN BASAL EPITHELIAL CELLS DEPENDING ON THE MORPHOLOGICAL TYPE OF THE REINKE'S SPACE

Наличие клеток базального эпителия с экспрессией bcl-2 Presence of basal epithelial cells expressing bcl-2	Гистологическая структура ткани полипа Histological structure of polyp tissue			
	Полипы голосовых складок Vocal cord polyps		Группа 3 Узелки голосовых складок Group 3 Nodules of the vocal folds (n = 7)	Группа 4 Отек Рейнке Group 4 Reinke's edema (n = 14)
	Группа 1 Ангиоматозный тип Group 1 Angiomatous type (n = 10)	Группа 2 Миксоидный тип Group 2 Mixoid type (n = 9)		
Позитивная экспрессия Positive expression	6 (60%)	1 (11,1%)	5 (71,4%)	3 (21,4 %)
Негативная экспрессия Negative expression	3 (30%)	8 (88,9%)	2 (28,6%)	11 (78,6 %)
Точный критерий Фишера, p Fisher exact, p		0,02	0,15	0,04

Примечание. См. примечание к таблице 2.

Note. As for Table 2.

например, CD4⁺ и CD8⁺Т-лимфоцитов, с экспрессией антигенов главного комплекса гистосовместимости класса II, так и другие типы иммунных клеток: макрофаги, дендритные клетки, НК-клетки, а также гранулоциты и эозинофилы, организованные в структурированные клеточные скопления [1, 16, 18]. Подобно тонкому кишечнику, более 90% популяции иммунных клеток гортани и области голосовых складок распределено диффузным образом по всему эпителию и собственной пластинке [24]. Наиболее высокое представительство дендритных клеток, NK-, Т- и В-клеток описано в подгортанных тканях (субглоттисе) и наиболее редкое – в области истинных голосовых складок [19]. Примечательно, что в тканях голосовых складок плода человека дендритные клетки, Т-, В-лимфоциты и макрофаги полностью отсутствуют [19, 25]. Показано, что субпопуляционный состав лимфоцитов МАЛТ гортани наиболее представлен в собственной пластинке по сравнению с эпителием, при этом В-лимфоциты практически отсутствуют в эпителиальном слое [26]. Несмотря на значительную межиндивидуальную вариабельность, данное исследование продемонстрировало преимущественную локализацию (CD8⁺) Т-лимфоцитов в более глубоких слоях слизистой МАЛТ гортани,

сопровождаемую высокой экспрессией МНС I и II класса. Авторы отмечают накопление CD3⁺, CD161⁺ лимфоцитов, определяющих фенотип NKT-клеток, в верхнем слое эпителия [26]. Наши исследования иммунофенотипа показали ряд особенностей касающихся соотношения и содержания иммунных клеток при формировании различных клинических форм ЭППР, объединенных единым патогенезом. При отеке Рейнке и миксоидной форме полипов в тканях установлено большее представительство основных популяций иммунных клеток (CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD20⁺), а при образованиях с преобладанием ангиоматозно-фиброзного компонента (ангиоматозный тип полипов, голосовые узелки) отмечена высокая численность клеток моноцитарно-макрофагального ряда CD68⁺ и клеток с экспрессией MMP-9⁺, что свидетельствует о более интенсивных процессах ремоделирования с последующей дегенерацией тканей. Однако, несмотря на схожесть этиологических факторов и общность механизмов патогенеза при формировании данной патологии, определенный вклад вносят особенности структурной организации различных зон голосовых складок и лимфодренажной системы надгортанника, подгортанного пространства, голосовых складок [20]. Лимфоид-

ТАБЛИЦА 6. СОДЕРЖАНИЕ РЕГУЛЯТОРОВ АПОПТОЗА В ТКАНЯХ ЭППР, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

TABLE 6. CONTENT OF APOPTOSIS REGULATORS IN EXUDATIVE LESIONS OF REINKE'S SPACE, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

Показатель, ед/мм ² Index, units/mm ²	Гистологическая структура ткани полипа Histological structure of polyp tissue							
	Полипы голосовых складок Vocal cord polyps				Группа 3 Узелки голосовых складок Group 3 Nodules of the vocal folds (n = 7)		Группа 4 Отек Рейнке Group 4 Reinke's edema (n = 14)	
	Группа 1 Ангиоматозный тип Group 1 Angiomatous type (n = 10)		Группа 2 Миксоидный тип Group 2 Mixoid type (n = 9)					
	лимфоциты lymphocytes	базальный эпителий basal epithelium	лимфоциты lymphocytes	базальный эпителий basal epithelium	лимфоциты lymphocytes	базальный эпителий basal epithelium	лимфоциты lymphocytes	базальный эпителий basal epithelium
bcl-2 ⁺ клетки bcl-2 ⁺ cells	68,3 (33,2-98,0)	4,1 (3,2-12,5)	10,2 (5,8-21,2)*	3,2 (2,2-4,6)	46,3 (38,3-67,1)	25,9 (19,3-34,2) [#]	13,1 (12,1-16,8)*	3,1 (1,5-3,5)
p53 ⁺ клетки p53 ⁺ cells	4,2 (3,5-5,4)	12,5 (2,3-50,5)	7,2 (6,5-8,9)	90,5 (76,3-125,3)**	5,5 (4,3-7,8)	16,8 (11,3-18,2)	19,2 (4,3-20,1)	287,1 (37,3-495,6)**

Примечание. * – значимые согласно критерию Манна–Уитни ($p \leq 0,02$) различия по количеству лимфоцитов с экспрессией bcl-2⁺ с группами 1, 3; [#] – различия по количеству клеток базального эпителия с экспрессией bcl-2⁺ с группами 1, 2, 4; ** – различия по количеству клеток базального эпителия с экспрессией p53⁺ с группами 1, 3.

Note. *, significant according to the Mann–Whitney test ($p \leq 0.02$) differences in the number of lymphocytes expressing bcl-2⁺ with groups 1, 3; [#], differences in the number of cells of the basal epithelium with the expression of bcl-2⁺ with groups 1, 2, 4; **, differences in the number of basal epithelial cells expressing p53⁺ with groups of 1, 3.

ные клетки из указанных областей гортани мигрируют преимущественно в глубокую шейную цепь лимфатических узлов [22]. Также формированию полипозно-измененной ткани голосовых складок способствует скопление отечной жидкости в рыхлой соединительной ткани пространства Рейнке, в силу недостаточного отведения тканевой жидкости по слабо развитым лимфатическим коллекторам плотных тканей голосовой связки и голосовой мышцы. Одним из общих моментов патогенеза являются значительные нарушения микроциркуляции в тканях, за счет лимфостаза, интерстициального отека, приводящие к гипоксически-ишемическим и далее дистрофическим изменениям в тканях с развитием фиброза, избыточной васкуляризацией стромы, ремоделированием соединительного матрикса, на что указывает показанное нами высокое содержание ММР-9 в тканях голосовых узелков и ангиоматозном типе полипов, одной из функций которой является деструкция коллагеновых структур, являющихся основой базальных мембран эпите-

лия и эндотелия микрососудов. Можно предположить, что при данных гистологических разновидностях высокая активность ММР-9 является одним из ведущих факторов, регулирующих проницаемость базальных мембран для жидкостных и форменных элементов крови, лимфы и перемещения тканевой жидкости [10]. В то же время, способность цинкзависимых эндопептидаз, в частности ММР – 1,9, разрушать все типы белков внеклеточного матрикса, приводит, с одной стороны, к повышению проницаемости тканей патологически измененной области голосовых складок, с другой, способствует инициации реакций иммунного реагирования на фрагменты деградации белков, хемотаксису и активации клеток моноцитарно-макрофагальной линии (CD68⁺), синтезу хемокинов и цитокинов различной функциональной направленности [13].

Поддержание клеточного гомеостаза МАЛТ гортани зависит от согласованной работы ингибиторов и индукторов апоптоза и может изменяться в зависимости от характера патологиче-

ского процесса. Известно, что белки семейства bcl-2 экспрессируются преимущественно в зонах патологически измененных тканей, содержащих пролиферирующие клетки, его задачей является пролонгация жизни клеточной популяции, в том числе пролиферирующих и дифференцирующихся клеток эпителия, иммунных клеток [12]. Bcl-2 способствует выживанию клеток путем связывания с фактором ингибирования апоптоза APAF1 и/или ингибирует каспазы за счет предотвращения выхода цитохрома С из митохондрий, тем самым блокируя альтернативный путь реализации апоптоза. Сочетание высокого содержания bcl-2-позитивных лимфоцитов и низкого содержания p53-позитивных клеток базального эпителия в тканях голосовых узелков и при ангиоматозном типе полипов отражает высокую способность к

выживанию клеточных популяций в условиях неоангиогенеза и формирования участков фиброза в условиях недостаточной оксигенации тканей. В то же время, при миксоидном типе полипов и отеке Рейнке, напротив, зафиксировано высокое содержание p53-позитивных клеток базального эпителия на фоне низкого содержания bcl-2-позитивных лимфоцитов и клеток базального эпителия, что свидетельствует о низком потенциале выживаемости данных клеток.

Все вышесказанное указывает на особую значимость мукозального иммунитета региона гортани при формировании различных клинико-морфологических вариантов экссудативных поражений пространства Рейнке, связанных рядом единых аспектов патогенеза.

Список литературы / References

1. Азнабаева Л.Ф., Арефьева Н.А., Даянов А.Н. Особенности местного иммунитета слизистой оболочки гортани в норме и при хронической воспалительной патологии // *Фундаментальные исследования*, 2011. № 9 (3). С. 373-376. [Aznabaeva L.F., Arefieva N.A., Dayanov A.N. Features of local immunity of the mucous membrane of the larynx in normal conditions and in chronic inflammatory pathology. *Fundamentalnye issledovaniya = Fundamental Research*, 2011, no. 9 (3), pp. 373-376. (In Russ.)]
2. Быкова В.П., Кочесокова Э.А., Иванченко Г.Ф., Ротова И.Д. Морфология полипов и слизистой оболочки голосовых складок при болезни Рейнке // *Архив патологии*, 2015. № 77 (1). С. 30-37. [Bykova V.P., Kochesokova E.A., Ivanchenko G.F., Rotova I.D. Morphology of polyps and mucous membranes of the vocal folds in Reinke's disease. *Arkhir patologii = Archives of Pathology*, 2015, no. 77 (1), pp. 30-37. (In Russ.)]
3. Василенко Ю.С. Голос. Фониатрические аспекты. М.: Энергоиздат, 2002. С. 186-195. [Vasilenko Yu.S. Voice. Phoniatic aspects]. Moscow: Energoizdat, 2002, pp. 186-195.
4. Дайхес Н.А., Быкова В.П., Пономарев А.Б., Давудов Х.Ш. Клиническая патология гортани. Руководство-атлас. М.: Медицинское информационное агентство, 2009. 160 с. [Daihes N.A., Bykova V.P., Ponomarev A.B., Davudov Kh.Sh. Clinical pathology of the larynx. Atlas guide]. Moscow: Medical Information Agency, 2009. 160 p.
5. Даянов А.Н. Местный иммунитет слизистой оболочки гортани в норме и при хроническом неспецифическом ларингите / А.Н. Даянов, Л.Ф. Азнабаева, Н.А. Арефьева // *Российская оториноларингология: Материалы конференции «Прикладная и фундаментальная наука – российской оториноларингологии»*. Приложение. 2010. № 1. С. 366-370. [Dayanov A.N. Local immunity of the mucous membrane of the larynx in the norm and in chronic nonspecific laryngitis / A.N. Dayanov, L.F. Aznabaeva, N.A. Arefieva. Materials of conference "Applied and fundamental science – Russian Otorhinolaryngology". Supplement. 2010. no. 1, pp. 366-370. (In Russ.)]
6. Копнин Б.П. Новые функции опухолевого супрессора p53: контроль клеточной архитектуры, адгезии и движения клеток // *Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН*, 2003. № 3. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://cyberleninka.ru/article/n/novye-funktsii-opuholevogo-supressora-r53-kontrol-kletochnoy-arhitektury-adgezii-i-dvizheniya-kletok>. [Kopnin B.P. New functions of the p53 tumor suppressor: control of cell architecture, adhesion and cell movement. *Vestnik RONTs im. N.N. Blokhina RAMS = Bulletin of N. Blokhin Russian Cancer Research Center of RAMS*, 2003, no. 3. [Electronic resource]. Access mode: <https://cyberleninka.ru/article/n/novye-funktsii-opuholevogo-supressora-r53-kontrol-kletochnoy-arhitektury-adgezii-i-dvizheniya-kletok>.
7. Мустафаев Д.М., Ашуров З.М., Зенгер В.Г., Осипенко Е.В., Массарыгин В.В., Копченко О.О. Эндоларингеальная микрохирургия доброкачественных новообразований гортани и объективная оценка их функциональных результатов // *Анналы пластической реконструктивной и эстетической хирургии*, 2008.

№ 2. С. 16-22. [Mustafaev D.M., Ashurov Z.M., Zenger V.G., Osipenko E.V., Massarygin V.V., Kopchenko O.O. Endolaryngeal microsurgery of benign laryngeal neoplasms and objective assessment of their functional results. *Annaly plasticheskoy rekonstruktivnoy i estetichnoy khirurgii = Annals of Plastic, Reconstructive and Aesthetic. Surgery*, 2008, no. 2, pp. 16-22. (In Russ.)]

8. Нестерова К.И., Бунова С.С., Аглиуллина Э.Г., Нестерова А.А. Глоточная симптоматика при кислотозависимых заболеваниях желудочно-кишечного тракта // Вестник КазНМУ, 2014. № 2 (3). С. 89-90. [Nesterova K.I., Bunova S.S., Agliullina E.G., Nesterova A.A. Pharyngeal symptoms in acid-dependent diseases of the gastrointestinal tract. *Vestnik KazNMU = Bulletin of Kazakh National Medical University*, 2014, no. 2 (3), pp. 89-90. (In Russ.)]

9. Пальчун В.Т., Магомедов М.М., Лучихин Л.А. Оториноларингология. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2016. 584 с. [Palchun V.T., Magomedov M.M., Luchikhin L.A. Otorhinolaryngology]. Moscow: GEOTAR-Media, 2016. 584 p.

10. Рогова Л.Н., Шестернина Н.В., Замечник Т.В., Фастова И.А. Матриксные металлопротеиназы, их роль в физиологических и патологических процессах // ВНМТ, 2011. Т. 18, № 2. С. 86-89. [Rogova L.N., Shesternina N.V., Zamechnik T.V., Fastova I.A. Matrix metalloproteinases, their role in physiological and pathological processes. *VNMT = Bulletin of New Medical Technologies*, 2011, Vol. 18, no. 2, pp. 86-89. (In Russ.)]

11. Степанова Ю.Е., Коноплев О.И., Готовяхина Т.В., Корень Е.Е., Мальцева Г.С. Острый и хронический ларингит у испытуемых, занимающихся голосовыми и речевыми профессиями // Вестник оториноларинголога, 2019. Т. 84, № 1. С. 68-71. [Stepanova Yu.E., Konoplev O.I., Gotovyakhina T.V., Koren E.E., Maltseva G.S. Acute and chronic laryngitis in subjects involved in voice and speech professions. *Vestnik otorinolaringologa = Bulletin of Otorhinolaryngologist*, 2019, Vol. 84, no. 1, pp. 68-71. (In Russ.)]

12. Тяжелова В.Г. Закономерности регулирования митохондриального апоптоза нейтрофилов // Фундаментальные исследования, 2013. № 8 (1). С. 108-113. [Tyazhelova V.G. Patterns of regulation of mitochondrial apoptosis of neutrophils. *Fundamentalnye issledovaniya = Fundamental Research*, 2013, no. 8 (1), pp. 108-113. (In Russ.)]

13. Шевченко А.В., Коненков В.И., Королев М.А., Убшаева Ю.Б., Прокофьев В.Ф. Полиморфизм генов матриксных металлопротеиназ MMP-2, MMP-3, MMP-9 у женщин с ревматоидным артритом // Терапевтический архив, 2015. Т. 87, № 12. С. 36-40. [Shevchenko A.V., Konenkov V.I., Korolev M.A., Ubshaeva I.B., Prokofyev V.F. Matrix metalloproteinase 2, 3, and 9 gene polymorphisms in women with rheumatoid arthritis. *Terapevticheskii arkhiv = Therapeutic Archive*, 2015, Vol. 87, no. 12, pp. 36-40. (In Russ.)]

14. Barker E. Early immunological changes associated with laryngeal transplantation in a major histocompatibility complex-matched pig model. *Clin. Exp. Immunol.*, 2006, Vol. 146, pp. 503-508.

15. Bohlender J. Diagnostic and therapeutic pitfalls in benign vocal fold diseases. *Laryngorhinootologie*, 2013, Vol. 92, no. 1, pp. 239-257.

16. Brook R.D., Rajagopalan S., Pope C.A., Brook J.R., Bhatnagar A., Diez-Roux A.V. Particulate matter air pollution and cardiovascular disease: An update to the scientific statement from the American Heart Association. *Circulation*, 2015, Vol. 121, 2331-2378.

17. Campagnolo A.G., Benninger M.S. Allergic laryngitis: chroniclaryngitis and allergic sensitization. *Braz. J. Otorhinolaryngol.*, 2019, Vol. 85, no. 3, pp. 263-266.

18. Debertin A.S. Coincidence of different structures of mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) in the respiratory tract of children: no indications for enhanced mucosal immunostimulation in sudden infant death syndrome (SIDS). *Clin. Exp. Immunol.*, 2006, Vol. 5, no. 146, pp. 54-59.

19. Dietrich C., Jecker P., Tschernig T., Mann W.J. Presence of dendritic cells, T lymphocytes, macrophages, B lymphocytes and glandular tissue in the human fetal larynx. *Acta Otolaryngol.*, 2004, Vol. 124, no. 7, pp. 833-838.

20. Duflo S.M., Thibeault S.L., Li W., Smith M.E., Schade G., Hess M.M. Differential gene expression profiling of vocal fold polyps and Reinke's edema by cDNA microarray. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.*, 2006, Vol. 115, no. 9, pp. 703-714.

21. Johns M.M. Update on the etiology, diagnosis, and treatment of vocal fold nodules, polyps, and cysts. *Curr. Opin. Otolaryngol. Head Neck Surg.*, 2003, Vol. 11, no. 6, pp. 456-461.

22. Koufman J.A., Amin M.R., Panetti M. Prevalence of reflux in 113 consecutive patients with laryngeal and voice disorders. *Otolaryngol. Head Neck Surg.*, 2012, Vol. 123, no. 4, pp. 385-388.

23. Martins R.H., Defaveri J., Domingues S., Silva R.J. Vocal polyps: clinical, morphological, and immunohistochemical aspects. *Voice*, 2011, Vol. 25, no. 1, pp. 98-106.

24. Rees L.E. Lifestyle factors influence immunology architecture of the human larynx. *Clin. Immunol.*, 2012, Vol. 118, pp. 324-327.

25. Segal L.N. Enrichment of the lung microbiome with oral taxa is associated with lung inflammation of a Th17 phenotype. *Nat. Microbiol.*, 2016, Vol. 1, 16031. doi: 10.1038/nmicrobiol.2016.31.
26. Tonti E.L. NKT cell help to B lymphocytes can occur independently of cognate interaction. *Blood*, 2008, Vol. 528, pp. 27-48.
27. Vasconcelos D., Gomes A., Araújo C. Vocal fold polyps: Literature review. *Int. Arch. Otorhinolaryngol.*, 2019, Vol. 23, no. 1, pp. 116-124.

Авторы:

Ковалев М.А. — заведующий отделением оториноларингологии Филиала № 3 ФГБУЗ «3 Центральный военный клинический госпиталь имени А.А. Вишневского», г. Одинцово, Россия

Давыдова Е.В. — д.м.н., заведующая отделением реабилитации ФГБУЗ «Челябинская областная клиническая больница», г. Челябинск, Россия

Зурочка А.В. — д.м.н., профессор кафедры пищевых и биотехнологий, заведующий лабораторией иммунобиотехнологии ФГАОУ ВО «Южно-Уральский государственный университет (Национальный исследовательский университет)», г. Челябинск; ведущий научный сотрудник лаборатории иммунологии воспаления ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук, г. Екатеринбург, Россия

Authors:

Kovalev M.A., Head, Department of Otorhinolaryngology, A. Vishnevsky 3rd Central Military Clinical Hospital (3rd Branch), Odintsovo, Russian Federation

Davydova E.V., PhD, MD (Medicine), Head, Rehabilitation Department, Chelyabinsk Regional Clinical Hospital, Chelyabinsk, Russian Federation

Zurochka A.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Food and Biotechnology, Head, Laboratory of Immunobiotechnology, South Ural State University (National Research University), Chelyabinsk; Leading Research Associate, Laboratory of Inflammation Immunology, Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, Russian Federation

Поступила 01.03.2022
Принята к печати 28.03.2022

Received 01.03.2022
Accepted 28.03.2022

РОЛЬ МОЛЕКУЛ АДГЕЗИИ L-SELECTIN И ICAM-1 У ДЕТЕЙ С БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ

Бережанский П.В.^{1,2}, Татаурщикова Н.С.¹, **Федоскова Т.Г.¹**,
Летяева О.И.¹, Русанова А.С.¹, Григорьева И.Н.¹, Камелева А.А.¹,
Добренская А.Е.¹, Василькова А.И.¹

¹ ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», Москва, Россия

² ГБУЗ «Морозовская детская городская клиническая больница Департамента здравоохранения города Москвы», Москва, Россия

Резюме. Бронхиальная астма (БА) является одним из наиболее распространенных хронических бронхолегочных заболеваний детского возраста, представляя серьезную медико-социальную и экономическую проблему.

БА представляет собой многофакторное заболевание, в развитии которого играют роль многие факторы. БА является хроническим воспалительным заболеванием, которое характеризуется активацией Т-опосредованных факторов, в том числе факторов адгезии в слизистой бронхов, а также минимальным персистирующим воспалением.

Минимальное персистирующее воспаление характеризуется как длительно идущий процесс воспаления (несмотря на полное отсутствие клинических проявлений) у пациентов с аллергопатологией и сопровождается повышенной экспрессией ICAM-1 (молекула межклеточной адгезии 1-го типа) и CD62L (L-селектин) в кровяном русле.

При аллергическом воспалении количество лимфоцитов и эозинофилов напрямую зависит от количества ICAM-1, так как именно молекулы межклеточной адгезии обеспечивают трансмиграцию эозинофилов и лейкоцитов через эндотелиальный барьер. Увеличение количества ICAM-1 напрямую зависит от образования различных активных форм кислорода, которые при БА продуцируются в избыточном количестве. В свою очередь ICAM-1 индуцируют изменение цитоскелета белков, которые играют значимую роль в патогенезе БА. Отмечено, что молекулы ICAM-1 и CD62L являются факторами, которые провоцируют изменения на микрореологическом уровне, в том числе и при респираторной патологии аллергического генеза. Доказано, что увеличение количества сосудистых молекул адгезии в дыхательных путях является важной частью патогенеза развития БА.

Максимальная экспрессия сосудистой молекулы клеточной адгезии 1 (VCAM-1) и ICAM-1 у людей с предрасположенностью к аллергическим заболеваниям может наступить через неопределенный промежуток времени и сразу же вызвать мощную дегрануляцию эозинофилов в респираторном тракте и капиллярном русле.

Также важным триггером обострения астмы является вирусная инфекция. Экспрессия молекулы межклеточной адгезии ICAM-1, клеточного рецептора для большинства риновирусов, на эпителиальных клетках увеличивается после инфицирования самим риновирусом. И эозинофилы, и нейтрофилы способствуют развитию тяжелой астмы или обострению астмы. Так как ICAM-1 является клеточным рецептором для большинства риновирусных инфекций, а именно адгезия эозинофилов к

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: Berezhansky-pv@rudn.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: Berezhansky-pv@rudn.ru

Образец цитирования:

П.В. Бережанский, Н.С. Татаурщикова,
Т.Г. Федоскова, О.И. Летяева, А.С. Русанова,
И.Н. Григорьева, А.А. Камелева, А.Е. Добренская,
А.И. Василькова «Роль молекул адгезии L-selectin
и ICAM-1 у детей с бронхиальной астмой» //
Медицинская иммунология, 2022. Т. 24, № 3. С. 519-526.
doi: 10.15789/1563-0625-ROL-2478
© Бережанский П.В. и соавт., 2022

For citation:

P.V. Berezhansky, N.S. Tataurschikova, T.G. Fedoskova,
O.I. Letyaeva, A.S. Rusanova, I.N. Grigorieva,
A.A. Kameleva, A.E. Dobrenkaya, A.I. Vasilkova "Role
of L-selectin and ICAM-1 adhesion molecules in children
with asthma", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya
Immunologiya, 2022, Vol. 24, no. 3, pp. 519-526.
doi: 10.15789/1563-0625-ROL-2478
DOI: 10.15789/1563-0625-ROL-2478

ICAM-1 помогает активации функций эозинофилов, следовательно адгезия эозинофилов к эпителиальным клеткам через ICAM-1 может активировать эозинофилы во время обострения астмы.

Изменения в системе иммуногемореологии у детей с БА являются стартовой точкой нарушений во всех звеньях гемостаза со склонностью к повышенной адгезивности и гиперкоагуляции, которые в свою очередь активируют целый каскад иммуно-метаболических нарушений и инициируют клиническое развитие БА. Для обострения БА характерен отчетливый паттерн экспрессии фактора адгезии ICAM-1 в зависимости от провоцирующего обструкцию агента. У пациентов с БА в зависимости от степени тяжести обострения имеются выраженные изменения при оценке показателей молекул адгезии: выраженное повышение ICAM-1 в период обструкции, вызванной и причинно-значимым аллергеном и инфекционным агентом, но более выраженное повышение в период поллинииции, а также незначительное повышение sL в период обструкции вызванной вирусным агентом.

Ключевые слова: бронхиальная астма, молекулы адгезии, вирус, аллергическое воспаление, обострение астмы

ROLE OF L-SELECTIN AND ICAM-1 ADHESION MOLECULES IN CHILDREN WITH ASTHMA

Berezhansky P.V.^{a, b}, Tataurschikova N.S.^a, Fedoskova T.G.^a,
Letyaeva O.I.^a, Rusanova A.S.^a, Grigorieva I.N.^a, Kameleva A.A.^a,
Dobrenkaya A.E.^a, Vasilkova A.I.^a

^a Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russian Federation

^b Morozov Pediatric Municipal Clinical Hospital, Moscow, Russian Federation

Abstract. Asthma is among the commonest chronic bronchopulmonary diseases in childhood, being a serious medical, social and economic problem. Asthma represents a multifactorial chronic inflammatory disease characterized by activation of T-mediated factors, including adhesion molecules in bronchial mucosa, as well as minimal persistent inflammation which is characterized by a long-term inflammatory process (despite complete absence of clinical manifestations) in the patients with allergic disorders accompanied by increased expression of ICAM-1 (type 1 intercellular adhesion molecule) and CD62L (L-selectin) in the bloodstream.

Lymphocyte and eosinophil counts in allergic inflammation show direct dependence on ICAM-1 contents, an intercellular adhesion molecule that provides transmigration of eosinophils and leukocytes through the endothelial barrier. Increased amount of ICAM-1 directly depends on excessive production of various reactive oxygen species in bronchial asthma. In turn, ICAM-1 induces changes in the cellular cytoskeleton which play a significant role in pathogenesis of asthma. It has been noted that ICAM-1 and CD62L molecules are those factors that exert changes at the microrheological level, including respiratory pathology of allergic nature. Increased amounts of vascular adhesion molecules in respiratory tract It has been proven are proven to be an important component of pathogenesis in bronchial asthma.

Maximal expression of vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) and ICAM-1 in the persons prone to allergic diseases may occur after undetermined time period, and it immediately causes pronounced degranulation of eosinophils in respiratory tract and capillary bed. Viral infection is also an important trigger for the asthma exacerbation. Epithelial expression of intercellular adhesion molecule ICAM-1, a cellular receptor for the most rhinoviruses, is increased after the rhinovirus infection itself. Both eosinophils and neutrophils contribute to the development of severe asthma, or exacerbation of asthma. ICAM-1 is a cellular receptor for rhinoviruses. Adhesion of eosinophils to ICAM-1 promotes functional activation of eosinophils. Therefore, adhesion of eosinophils to epithelial cells via ICAM-1 may activate this population during exacerbation in bronchial asthma.

Changes in the immunohemoreology system in children with bronchial asthma represent the starting point of disorders at either hemostatic pathways, with a trend for increased adhesiveness and hypercoagulability, thus activating entire cascade of immunometabolic disorders and initiate clinical development of asthma. Exacerbation of asthma is characterized by the distinct expression pattern of the ICAM-1 adhesion factor, depending on the agent which promotes the airway obstruction. In the patients with asthma, depending on severity of exacerbation, there are pronounced changes in the levels of adhesion molecules. A pronounced increase in ICAM-1 at the time of bronchial obstruction is caused by the both causal allergen and infectious agent. However, more pronounced increase occurs during pollination, as well as slight elevation is observed in the course of obstruction caused by an infectious agent.

Keywords: asthma, adhesion molecules, virus, allergic inflammation, asthma exacerbation

Введение

Бронхиальная астма (БА) является одним из наиболее распространенных хронических бронхолегочных заболеваний детского возраста, которое требует постоянного контроля и представляет серьезную медико-социальную и экономическую проблему [11, 19]. Около 339 миллионов человек во всем мире страдают от БА [2].

Астма характеризуется обратимыми симптомами хрипов, одышки, стеснения в груди и/или кашлем, а также сопровождается затруднением выдоха. Эти изменения часто вызваны такими факторами, как физическая нагрузка, воздействие аллергенов или вирусными респираторными инфекциями [2, 4].

Возраст начала БА играет важную роль в прогнозировании клинического течения и лечении этого заболевания [7]. Изучение этиопатогенетических механизмов течения БА позволит повысить эффективность ранней диагностики, лечения и профилактики. И, как результат, улучшит качество жизни детей и их родителей.

БА является хроническим воспалительным заболеванием, которое характеризуется активацией Т-опосредованных факторов, в том числе факторов адгезии в слизистой бронхов. Множество факторов адгезии и воспаления напрямую причастны к аллергическому иммунному ответу при БА [8]. Определение факторов адгезии в отсутствии альтернативных методик у детей дошкольного возраста помогут предвидеть развитие у них БА [14]. Уровень ICAM-1 ($p = 0,02$) и уровень экспрессии генов ICAM-1 ($p = 0,01$) тесно связаны с развитием БА у детей на уровне ДНК, мРНК и белковом уровне. Экспрессия ICAM-1 положительно связана с развитием БА ($p = 0,01$) [14].

Минимальное персистирующее воспаление характеризуется как длительно идущий процесс воспаления (несмотря на полное отсутствие клинических проявлений) у пациентов с аллергопатологией и сопровождается повышенной экспрессией ICAM-1 (молекула межклеточной адгезии 1-го типа) и CD62L (L-селектин) в кровяном русле [6, 21].

При аллергическом воспалении количество лимфоцитов и эозинофилов напрямую зависит от количества ICAM-1 и VCAM-1, так как именно молекулы межклеточной адгезии обеспечивают трансмиграцию эозинофилов и лейкоцитов через эндотелиальный барьер. Увеличение количества ICAM-1 напрямую зависит от образования различных активных форм кислорода, которые при БА продуцируются в избыточном количестве. В свою очередь ICAM-1 индуцирует изменение

цитоскелета белков, которые играют значимую роль в патогенезе БА [3, 20, 23, 24].

Увеличение количества ICAM-1 ведет к возрастанию содержания внутриклеточного кальция в эндотелиальных клетках. В свою очередь митохондриальный кальций активизирует рецепторы $\text{TNF}\alpha$, вызывая усиление экспрессии самих селектинов и активацию их рецепторов. ICAM-1 является потенциальным фактором для целенаправленного лечения больных с тяжелой БА [5, 16, 17].

Максимальная экспрессия ICAM-1 у людей с предрасположенностью к аллергическим заболеваниям может наступить через неопределенный промежуток времени и сразу же вызвать мощную дегрануляцию эозинофилов в респираторном тракте и капиллярном русле [10].

Сочетание факторов адгезии с селектинами увеличивает и пролонгирует действие $\text{TNF}\alpha$ в условиях иммуноопосредованного воспаления, что стимулирует хемотаксис клеток воспаления, но препятствует их трансмиграции через эндотелий капилляров [1, 12].

Также важным триггером обострения астмы является вирусная инфекция. Экспрессия молекулы межклеточной адгезии ICAM-1, клеточного рецептора для большинства риновирусов, на эпителиальных клетках увеличивается после инфицирования самим риновирусом. И эозинофилы, и нейтрофилы способствуют развитию тяжелой астмы или обострению астмы. Так как ICAM-1 является клеточным рецептором для большинства риновирусных инфекций, а именно адгезия эозинофилов к ICAM-1 помогает активации функций эозинофилов, следовательно адгезия эозинофилов к эпителиальным клеткам через ICAM-1 может активировать эозинофилы во время обострения астмы [18].

Итак, изменения в системе иммуногеморегуляции у детей с БА являются стартовой точкой нарушений во всех звеньях гемостаза со склонностью к повышенной адгезивности и гиперкоагуляции, которые в свою очередь активируют целый каскад иммуно-метаболических нарушений и инициируют клиническое развитие БА.

Цель исследования — оценить роль молекул адгезии (L-селектин — sL и ICAM-1) в сыворотке крови пациентов с БА в период обострения, вызванного различными провоцирующими агентами.

Материалы и методы

В исследование было включено 29 детей (Гр. 1) в возрасте от 4 до 7 лет с установленным клиническим диагнозом БА с пыльцевой сенсibilизацией и 10 здоровых детей I-II группы здоровья

(Гр.2). Забор анализов осуществлялся дважды в периоды обострения — в сезон поллинозиса и обострения, вызванного вирусной инфекцией. Всем обследованным пациентам диагноз был установлен за 1 год до поступления в стационар. В период нахождения в стационаре оценивали IgE и sIgE, ПЦР ОРВИ, антитела к хламидиям и микоплазмам.

В период обострения БА при поступлении производился забор крови для определения концентрации ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule 1) и L-селектина (Lymphocyte Adhesion Molecule 1) методом ИФА (набор реактивов ELISA, Cusabio Biotech Co., Ltd, США).

Статистическая обработка результатов исследования проводилась посредством пакета компьютерных программ SPSS Statistics 17.0. Анализ вида распределения полученных количественных данных проводился на основании критерия Шапиро–Уилка. Для статистической обработки как качественных, так и количественных параметров использовались непараметрические статистические критерии Уилкоксона, U-критерий Манна–Уитни, χ^2 . Взаимосвязь между признаками оценивалась методом ранговой корреляции по Спирмену. Определялись следующие статистические характеристики: среднее значение и их стандартная ошибка, результаты представлены в виде ($M \pm m$).

Результаты

Гендерный состав изучаемой группы: мальчики 62% ($n = 18$) и девочки 38% ($n = 11$). В ходе оценки отягощенности личного и социального анамнеза выявлено, что 41,4% ($n = 12$) имели отягощенный наследственный анамнез по аллергическим заболеваниям (БА и аллергический ринит), собственный алергоанамнез по аллергическому риниту и atopическому дерматиту был выявлен у 48,3% ($n = 14$), 17,2% ($n = 5$) детей были рождены недоношенными, 37,9% ($n = 11$) имели эпизод перенесенного бронхолита в раннем возрасте. Также было выявлено, что 27,6% ($n = 8$) детей имели в анамнезе выставленный диагноз «последствия перинатального поражения центральной нервной системы гипоксическо-ишемического генеза (ППЦНС)».

Известно, что генетическая предрасположенность и отягощенная наследственность по БА является ведущим фактором развития БА, которая наследуется с вероятностью 80% по линии матери и является проявлением у ребенка бронхиальной астмы в 70–80% случаев.

Также генетические факторы являются развитием такого состояния, как atopический марш,

который начинается с atopического дерматита и прогрессирует до IgE-опосредованной пищевой аллергии, астмы и аллергического ринита.

В контексте atopического марша важно отметить, что IgE является патофизиологическим медиатором некоторых, но не всех «atopических» заболеваний. Таким образом, atopический марш лучше рассматривать как прогрессирование аллергических состояний, которые имеют общие генетические и предрасполагающие факторы окружающей среды, общие иммунологические особенности одного или нескольких аллерген-специфических Т-хелперов 2-го типа (Th 2) и характеризуются эффекторной фазой «типа 2», которая может включать образование специфического IgE, активацию гранулоцитов и другие врожденные особенности, такие как образование слизи и отек, что является важным патогенетическим звеном БА [9, 13].

Вирусные инфекции являются наиболее частой причиной инфекций верхних и нижних дыхательных путей. Наиболее часто выявляемыми вирусами, вызывающими инфекции дыхательных путей у детей, являются риновирусы человека (BCR), респираторно-синцитиальный вирус (РСВ), вирусы гриппа и парагриппа, коронавирус, аденовирус, метапневмовирус человека и бокавирус. Известно, что существует связь между частыми ОРВИ в первые годы жизни и развитием в дальнейшем вирусиндуцированных обструкций и астмы [22].

Для каждого пациента ретроспективно оценивался индекс респираторной заболеваемости (ИРЗ) — отношение числа острых респираторных инфекций (ОРИ) к возрасту ребенка в годах. Было выявлено, что дети, имеющие отягощенный анамнез в виде недоношенности или наличия ППЦНС, имели более высокий ИРЗ — 0,66 и более частые вирусиндуцированные обструкции. В то время как дети без отягощенного личного анамнеза имели ИРЗ 0,41.

Известно, что воздействие табака в окружающей среде увеличивает риск астмы в раннем возрасте. Как пренатальное, так и послеродовое курение матери значительно увеличивает риск реализации астмы во всех возрастных группах, особенно в дошкольном и младшем школьном возрасте. В то время как отцовское курение чаще является более значимым фактором риска у детей в возрасте 5–18 лет [15].

В нашем исследовании выявлено курение родителей в семьях в 55,1% ($n = 17$) случаев, из них 29,4% ($n = 5$) — курят оба родителя, 23,6% ($n = 4$) — курение только матери и 47% ($n = 8$) — курение только отца.

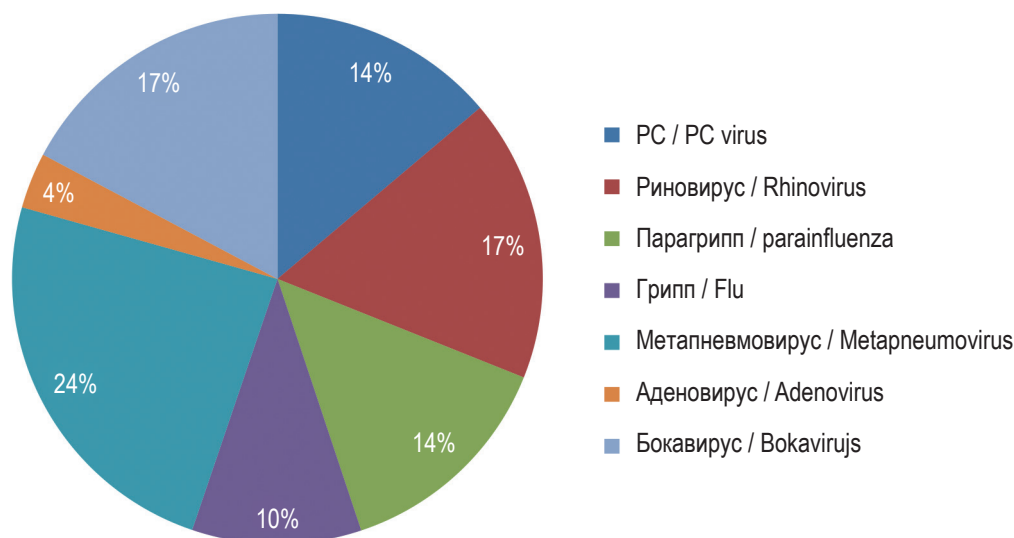


Рисунок 1. Этиология вирус-индуцированных обострений бронхиальной астмы

Figure 1. Etiology of virus-induced exacerbations of bronchial asthma

В стационаре при поступлении методом ПЦР диагностики были определены основные этиологические факторы инфекционного обострения БА, которые представлены на рисунке 1: респираторно-синцитиальный вирус 13,8% ($n = 4$), риновирус 17,2% ($n = 5$), вирус парагриппа 13,8% ($n = 4$), вирус гриппа 10,3% ($n = 3$), метапневмовирус 24,1% ($n = 7$), аденовирус 3,4% ($n = 1$), бокавирус 17,2% ($n = 5$), из которых ко-инфекция установлена у 24,1% ($n = 7$) детей, микоплазма выявлена у 2 детей как компонент ко-инфекции 6,9% ($n = 2$) (рис. 1).

При первичном обращении в период поллиноза 20,7% детей ($n = 6$) были госпитализированы в отделение реанимации с выраженной дыхательной недостаточностью. Средний срок госпитализации в этот период составил $11,2 \pm 1,4$ дня.

При обращении с обструкцией, вызванной вирусным агентом, 3,5% детей ($n = 1$) были госпитализированы в отделение реанимации. Средний срок госпитализации в этот период составил $7,2 \pm 2,2$ дня.

Что, возможно, связано с тем, что вдыхание аллергена приводит к острому бронхоспазму с последующим притоком воспалительных клеток, что вызывает выраженную и более длительную клиническую картину астматической реакции. Бронхиальная астма — это в основном Th2-управляемый процесс в уже сенсibilизированном организме [4]. В том случае, когда провоцирующим фактором является вирусная инфекция иммунный ответ организма частично идет по другому пути, что обуславливает меньшую вовле-

ченность сенсibilизированных тканей в патогенетический механизм вирус-индуцированной обструкции и более быстрый срок выздоровления.

Выявлено, что у детей с более выраженной клинической картиной обструкции, вызванной инфекционным агентом, этиологическим фактором чаще были метапневмовирус 24,1% ($n = 7$). Пациенты, у которых был выявлен риновирус, имели выраженную аускультативную картину с более длительным периодом регресса клинической картины, по сравнению с пациентами, у которых обструкция была вызвана другими вирусными агентами.

За время госпитализации у всех детей в период обострения, вызванного инфекционным агентом, или в период поллиноза не были выявлены проявления бактериальной инфекции.

При оценке уровня ICAM-1 выявлено, что ICAM-1 был повышен во всех результатах забора анализов, но в период обострения БА, вызванного причинно-значимыми аллергенами растений, данный показатель был гораздо выше, чем в группе здоровых детей, соответственно Гр. 1 (в период цветения) — $398,8 \pm 54,2$ нг/мл, Гр. 1 (в период вирусной инфекции) $366,2 \pm 39,7$ нг/мл, Гр. 2 — $162,3 \pm 40,1$ нг/мл (рис. 2).

Выявлено, что в Гр. 1 в период обострения БА в сезон цветения аллергенных растений отмечалось повышение sL 1811 ± 266 нг/мл по сравнению с Гр. 2, где sL был 1164 ± 203 нг/мл, $p < 0,05$. Во время обострения БА на фоне вирус-

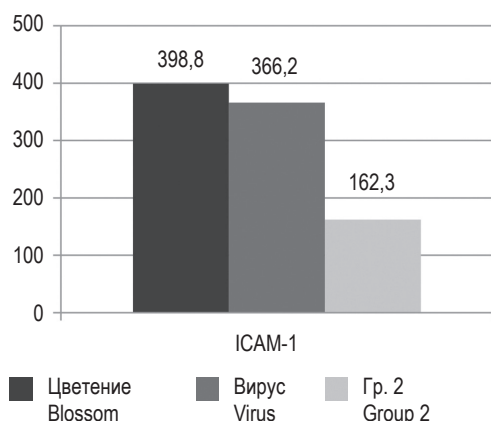


Рисунок 2. Концентрация ICAM-1 в крови

Figure 2. ICAM-1 concentration in blood

ной инфекции уровень sL был значительно выше 2282 ± 394 нг/мл (рис. 3).

При проведении корреляционного анализа выявлено, что у детей с БА отмечались достоверные корреляционные взаимосвязи между такими показателями в период цветения, как ICAM-1 и sL ($r = -0,69$), ICAM-1 и IgE ($r = 0,67$), sL и IgE ($r = -0,57$). В период обострения, вызванного инфекционным агентом, выявлены следующие корреляционные зависимости ICAM-1 и IgE ($r = 0,63$).

Обсуждение

Наличие минимального персистирующего воспаления у пациентов с бронхиальной астмой сопровождается повышенной экспрессией ICAM-1 и CD62L в кровяном русле.

Более частые госпитализации в палаты интенсивной терапии при обструкции, вызванной поллинозисом, связаны с тем, что вдыхание аллергена приводит к острому бронхоспазму с последующим притоком воспалительных клеток, что вызывает выраженную и более длительную клиническую картину астматической реакции. Бронхиальная астма — это в основном Th2-управляемый процесс в уже сенсibilизированном организме [4]. В том случае, когда провоцирующим фактором является вирусная инфекция иммунный ответ организма частично идет по другому пути, что обуславливает меньшую вовлеченность сенсibilизированных тканей в патогенетический механизм вирус-индуцированной обструкции и более быстрый срок выздоровления.

Пациенты с риновирусом и метапневмовирусом имели более высокий показатель ICAM-1 и sL, чем пациенты с другой инфекцией. Возможно, это связано с более сильным воздействием этих вирусных агентов на посткапиллярные эндотелиальные клетки, способствующим более

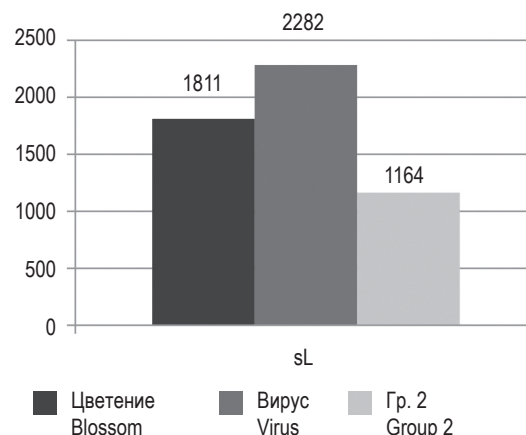


Рисунок 3. Концентрация L-селектин в крови

Figure 3. Blood concentration of L-selectin

выраженной экспрессии этих молекул, которые в свою очередь способствуют более активной адгезии циркулирующих лейкоцитов к эндотелиальным клеткам, вызывая более выраженную клиническую картину.

Возможно, что различные пневмовирусы имеют разное воздействие на эпителиальный барьер и с различной силой направляют иммунный ответ в пользу Th2 даже в период обострения, вызванного инфекционным агентом, что играет ведущую роль в гиперреактивности бронхов и выраженности клинической картины. Вирусы с различной интенсивностью иницируют транскрипцию защитных факторов с образованием интерлейкинов, которые в свою очередь влияют на хемотаксис моноцитов, макрофагов, эозинофилов и тучных клеток, секретирующих гистамин и липидные медиаторы воспаления (в основном лейкотриены и простагландины). У пациентов с БА уже имеется определенный паттерн для иммунного гиперответа и, возможно, увеличенное количество клеток участников воспалительного процесса в стенках бронхов при вирусных инфекциях обуславливает особенности клинической картины в данной группе пациентов.

Заключение

Для обострения БА характерен отчетливый паттерн экспрессии фактора адгезии ICAM-1 в зависимости от провоцирующего обструкцию агента. У пациентов с БА в зависимости от степени тяжести обострения имеются выраженные изменения при оценке показателей молекул адгезии: выраженное повышение ICAM-1 в период обструкции, вызванной и причинно-значимым аллергеном и инфекционным агентом, но более выраженное повышение в период поллиноза, а также незначительное повышение sL в период обструкции, вызванной инфекционным агентом.

Полученные данные свидетельствуют о наличии связи между провоцирующим агентом обострения БА и концентрациями молекул адгезии в сыворотке крови. Плазменный уровень sL, в отличие от ICAM-1, имеет более избирательную роль в развитии обострения БА, что может являться перспективным инструментом мониторинга

контроля воспаления при БА в педиатрической практике. Также имеется предположение, что различные инфекционные агенты оказывают избирательное влияние на посткапиллярные эпителиальные клетки дыхательных путей, вызывая различные варианты клинического течения заболевания, что требует дальнейшего изучения.

Список литературы / References

1. Бережанский П.В., Татаурщикова Н.С. Особенности изменений в системе микроциркуляции у детей с аллергическим ринитом в зависимости от выраженности дисфункции вегетативной нервной системы // Медицинская иммунология, 2021. Т. 23, № 1. С. 169-172. [Berezhansky P.V., Tataurshchikova N.S. Features of changes in the microcirculation system in children with allergic rhinitis depending on the severity of dysfunction of the autonomic nervous system. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2021, Vol. 23, no. 1, pp. 169-172. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-CFO-1997.
2. Чучалин А.Г. Стандартизированные эпидемиологические исследования аллергических заболеваний у детей. Адаптация программы «Международное исследование астмы и аллергии у детей (ISAAC)» в России: Пособие для врачей / Под ред. А.Г. Чучалина. М., 1998. 30 с. [Chuchalin A.G. Standardized epidemiological studies of allergic diseases in children. Adaptation of the program "International Asthma and Allergy Study in Children (ISAAC)" in Russia: A Manual for Physicians / Ed. A.G. Chuchalin]. Moscow, 1998. 30 p.
3. Abdala-Valencia H., Berdnikovs S., Joan M. Vitamin E isoforms differentially regulate intercellular adhesion Molecule-1-Activation of PKC α in human microvascular endothelial cells. *MillsPLoSOne*, 2012, Vol. 7, pp. 41-54.
4. Akar-Ghibril N., Casale T., Custovic A., Phipatanakul W. Allergic endotypes and phenotypes of asthma. *J. Allergy Clin. Immunol. Pract.*, 2020, Vol. 8, no. 2, pp. 429-440.
5. Carman C.V., Jun C.-D., Salas A., Springer T.A. Endothelial cells proactively form microvilli – like membrane projections upon intercellular adhesion molecule 1 engagement of leukocyte LFA-1. *J. Immunol.*, 2003, Vol. 171, no. 11, pp. 6135-6144.
6. Chetta A., Zanini A., Foresiet A. Vascular endothelial growth factor up – regulation and bronchial wall remodelling in asthma. *Clin. Exp. Allergy*, 2005, Vol. 35, no. 11, pp. 1437-1442.
7. de Nijs S.B., Venekamp L.N., Bel E.H. Adult-onset asthma: is it really different? *Eur. Respir. Rev.*, 2013, Vol. 22, no. 127, pp. 44-52.
8. Eusebio M. Comparison of changes in the percentages of CD8⁺CD28⁻ TCR alpha beta⁺ T cell subpopulations in allergic asthma subjects vs controls before and after anti-CD3/anti-CD28/IL-2 stimulation *in vitro*. *J. Biol. Regul. Homeost. Agents*. 2013, Vol. 27, no. 4, pp. 969-979.
9. Hill D., Spergel J.M. The Atopic March: Critical evidence and clinical relevance. *Ann. Allergy Asthma Immunol.*, 2018, Vol. 120, no. 2, pp. 131 -137.
10. Hu G., Vogel S.M., Schwartz D.E. Intercellular adhesion molecule-1-dependent neutrophil adhesion to endothelial cells induces caveolae-mediated pulmonary vascular hyperpermeability. *Circ. Res.*, 2008, Vol. 102, no. 12 pp. e120-e131.
11. Jacob L.H., Annelies K., Zwitterloot M. Asthma, bronchial hyperresponsiveness, allergy and lung function development until early adulthood: A systematic literature review. *Pediatr. Allergy Immunol.*, 2021, Vol. 32, no. 6, pp. 1238-1254.
12. Kast R.E. Tumor necrosis factor has positive and negative self regulatory feed back cycles centered around cAMP. *Int. J. Immunopharmacol.*, 2000, Vol. 22, no. 11, pp. 1001-1006.
13. Khan V.V., Tataurshchikova N.S., Nurpeissov T.T. The Prevalence of atopic dermatitis among children and adults in Kazakhstan. In: advanced technologies for sustainable development of urban green infrastructure. 2021, pp. 194-201.
14. Klaassen E.M. Integrative genomic analysis identifies a role for intercellular adhesion molecule 1 in childhood asthma. *Pediatr. Allergy Immunol.*, 2014, Vol. 25, no. 2, pp. 166-172.
15. Kuruvilla M., Vanijcharoenkarn K., Shih J.A., Lee F. Epidemiology and risk factors for asthma. *Respir. Med.*, 2019, Vol. 149, pp. 16-22.
16. Martinelli R. ICAM1-mediated endothelial nitric oxide synthase activation via calcium and AMP – activated protein kinase is required for transendothelial lymphocyte migration. *Mol. Biol. Cell*, 2009, Vol. 20, no. 3, pp. 995-1005.
17. Matsuda A., Fukuda S., Matsumoto K., Saito H. Th1/Th2 cytokines reciprocally regulate *in vitro* pulmonary angiogenesis via CXC chemokine synthesis. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.*, 2008, Vol. 38, no. 2, pp. 168-175.
18. Nakagome K., Nagata M. Involvement and possible role of eosinophils in asthma exacerbation. *Front. Immunol.*, 2018, Vol. 9. 2220. doi: 10.3389/fimmu.2018.02220.

19. Nurmagambetov T., Kuwahara R., Garbe P. The economic burden of asthma in the United States, 2008-2013. *Ann. Am. Thorac. Soc.*, 2018, Vol. 15, no. 3, pp. 348-356.
20. Sumagin R., Sarelius I.H. Intercellular adhesion molecule-1 enrichment near tricellular endothelial junctions is preferentially associated with leukocyte transmigration and signals for reorganization of these junctions to accommodate leukocyte passage. *J. Immunol.*, 2010, Vol. 184, no. 9, pp. 5242-5252.
21. Tataurschikova N.S., Berezhansky P.V. Some features of the key phenotypes of allergic rhinitis among children in a metropolis. *Springer Geography*, 2021, pp. 202-208.
22. Toskala E., Kennedy D.W. Asthma risk factors. *Int. Forum Allergy Rhinol.*, 2015, Vol. 5, Suppl. 1, pp. S11-S16.
23. Tsakadze N.L., Zhao Z., D'Souza S.E. Interactions of intercellular adhesion molecule-1 with fibrinogen. *Trends Cardiovasc. Med.*, 2002, Vol. 12, no. 3, pp. 101-108.
24. Wang Q., Doerschuk C.M. The signaling pathways induced by neutrophil – endothelial cell adhesion. *Antioxid. Redox Signal.*, 2002, Vol. 4, no. 1, pp. 39-47.

Авторы:

Бережанский П.В. — к.м.н., ассистент кафедры клинической иммунологии, аллергологии и адапталоги ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов»; заведующий пульмонологическим отделением ГБУЗ «Морозовская детская городская клиническая больница Департамента здравоохранения города Москвы», Москва, Россия

Татауришкова Н.С. — д.м.н., профессор, заведующая кафедрой клинической иммунологии, аллергологии и адапталоги ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», Москва, Россия

Федоскова Т.Г. — д.м.н., профессор кафедры клинической иммунологии, аллергологии и адапталоги ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», Москва, Россия

Летяева О.И. — д.м.н., профессор кафедры клинической иммунологии, аллергологии и адапталоги ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», Москва, Россия

Русанова А.С. — преподаватель кафедры клинической иммунологии, аллергологии и адапталоги ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», Москва, Россия

Григорьева И.Н. — к.м.н., ассистент кафедры клинической иммунологии, аллергологии и адапталоги ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», Москва, Россия

Камелева А.А. — к.м.н., ассистент кафедры клинической иммунологии, аллергологии и адапталоги ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», Москва, Россия

Добренская А.Е. — ординатор кафедры клинической иммунологии, аллергологии и адапталоги ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», Москва, Россия

Василькова А.И. — ординатор кафедры клинической иммунологии, аллергологии и адапталоги ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», Москва, Россия

Authors:

Berezhansky P.V., PhD (Medicine), Assistant Professor, Department of Clinical Immunology, Allergology and Adaptology, Peoples' Friendship University; Head, Pulmonology Department, Morozov Pediatric Municipal Clinical Hospital, Moscow, Russian Federation

Tataurschikova N.S., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Clinical Immunology, Allergology and Adaptology, Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russian Federation

Fedoskova T.G., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Clinical Immunology, Allergology and Adaptology, Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russian Federation

Letyaeva O.I., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Clinical Immunology, Allergology and Adaptology, Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russian Federation

Rusanova A.S., Teacher, Department of Clinical Immunology, Allergology and Adaptology, Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russian Federation

Grigorieva I.N., PhD (Medicine) Assistant Professor, Department of Clinical Immunology, Allergology and Adaptology, Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russian Federation

Kameleva A.A., PhD (Medicine), Assistant Professor, Department of Clinical Immunology, Allergology and Adaptology, Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russian Federation

Dobrenskaya A.E., Clinical Resident, Department of Clinical Immunology, Allergology and Adaptology, Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russian Federation

Vasilkova A.I., Clinical Resident, Department of Clinical Immunology, Allergology and Adaptology, Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russian Federation

Поступила 21.02.2022
Отправлена на доработку 22.02.2022
Принята к печати 27.02.2022

Received 21.02.2022
Revision received 22.02.2022
Accepted 27.02.2022

ДИНАМИКА ЛОКАЛЬНОГО ЦИТОКИНОВОГО СТАТУСА У ПАЦИЕНТОВ С СИАЛАДЕНОЗОМ ОКОЛОУШНЫХ СЛЮННЫХ ЖЕЛЕЗ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ АЛГОРИТМА ЛЕЧЕНИЯ

Сультимова Т.Б.¹, Козлова М.В.¹, Гапонов А.М.², Савлевич Е.Л.¹,
Козлов И.Г.^{3,4}

¹ ФГБУ ДПО «Центральная государственная медицинская академия» Управления делами Президента Российской Федерации, Москва, Россия

² ФГБУН «Научно-исследовательский институт общей реаниматологии имени В.А. Неговского, Москва, Россия

³ ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ (Сеченовский университет), Москва, Россия

⁴ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Резюме. Сиаладенозом считают дистрофическое заболевание паренхимы слюнных желез (СЖ), которое приводит к секреторным нарушениям и гипертрофии СЖ. При присоединении вторичных воспалительных явлений развивается сиаладенит. Стандартные методы и препараты для лечения сиаладенозов приводят к регрессу клинических проявлений и полугодовой ремиссии. Использование растительных экстрактов с механизмом пролонгированного действия оказывает длительный местный противовоспалительный эффект с минимальными побочными явлениями, в том числе и со стороны слизистой оболочки рта. Однако их применение в комплексном лечении сиаладенозов изучено недостаточно. Целью исследования являлась оценка динамики цитокинового статуса в паротидном секрете больных сиаладенозом с гипотиреозом на фоне комплексного лечения с применением препарата растительного происхождения пролонгированного действия.

52 пациента с сиаладенозом околоушной слюнной железы (ОУСЖ) при гипотиреозе разделили на 2 группы: в I группе 26 человек получали базовую терапию, во II группе 26 больным применялась базовая терапия и дополнительно вводился фитопрепарат в виде рассасывающихся таблеток пролонгированного действия. Группа контроля состояла из 20 условно здоровых людей без патологии со стороны ОУСЖ и щитовидной железы. Сравнительный анализ проводился через 1 и 6 месяцев от начала лечения по клинической картине, сиалометрии и цитокиновому статусу. Содержание интерлейкинов IL-1 β , IL-6, IL-10 и фактора некроза опухоли- α (TNF) определяли в секрете ОУСЖ с помощью иммуноферментного анализа.

Адрес для переписки:

Козлова Марина Владленовна
ФГБУ ДПО «Центральная государственная медицинская академия» Управления делами Президента Российской Федерации
121359, Россия, Москва, ул. Маршала Тимошенко, 19, стр. 1а.
Тел.: 8 (499) 241-08-57.
E-mail: profkoz@mail.ru

Address for correspondence:

Kozlova Marina V.
Central State Medical Academy, Department for Presidential Affairs of the Russian Federation
121359, Russian Federation, Moscow, Marshal Timoshenko str., 19, bldg 1a.
Phone: 7 (499) 241-08-57.
E-mail: profkoz@mail.ru

Образец цитирования:

Т.Б. Сультимова, М.В. Козлова, А.М. Гапонов, Е.Л. Савлевич, И.Г. Козлов «Динамика локального цитокинового статуса у пациентов с сиаладенозом околоушных слюнных желез в зависимости от алгоритма лечения» // Медицинская иммунология, 2022. Т. 24, № 3. С. 527-538.
doi: 10.15789/1563-0625-DOL-2473
© Сультимова Т.Б. и соавт., 2022

For citation:

T.B. Sultimova, M.V. Kozlova, A.M. Gaponov, E.L. Savlevich, I.G. Kozlov "Dynamics of local cytokine status in patients with parotid salivary gland sialadenosis depending on the treatment algorithm", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2022, Vol. 24, No. 3, pp. 527-538.
doi: 10.15789/1563-0625-DOL-2473
DOI: 10.15789/1563-0625-DOL-2473

У пациентов I группы наблюдались обострения в течение полугода после базового лечения, также данные сиалометрии свидетельствовали о сохраненной сниженной функции околоушной слюнной железы. Во II группе на фоне базового лечения и дополнительно введенного фитопрепарата через 6 месяцев отсутствовала ярко выраженная клиническая картина сиаладеноза. Показатели сиалометрии нормализовались и интерпретировались, что секреторная функция ОУСЖ увеличилась. Следовательно, это сказывалось на увлажнении слизистой оболочка рта и улучшении качества жизни пациентов. Уровень регресса IL-1 β , IL-6 и TNF и повышения IL-10 в секрете околоушной слюнной железы был достоверно выше при лечении фитопрепаратом по сравнению с I группой, где применялся традиционный протокол, через 1 и 6 месяцев после проведенного лечения.

Дополнение стандартной схемы лечения сиаладеноза фитопрепаратом местного пролонгированного действия является целесообразным и эффективным.

Ключевые слова: слюнные железы, слюна, сиаладеноз, сиаладенит, ксеростомия, гипосаливация, гипотиреоз, провоспалительные цитокины IL-1 β , IL-6, TNF, противовоспалительный интерлейкин IL-10, фитопрепарат

DYNAMICS OF LOCAL CYTOKINE STATUS IN PATIENTS WITH PAROTID SALIVARY GLAND SIALADENOSIS DEPENDING ON THE TREATMENT ALGORITHM

Sultimova T.B.^a, Kozlova M.V.^a, Gaponov A.M.^b, Savlevich E.L.^a,
Kozlov I.G.^{c,d}

^a Central State Medical Academy, Department for Presidential Affairs of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation

^b V. Negovsky Research Institute of General Resuscitation, Moscow, Russian Federation

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

^d D. Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Moscow, Russian Federation

Abstract. Sialadenosis is a dystrophic disease of the salivary glands parenchyma, which leads to secretory disorders and hypertrophy of salivary glands. Sialadenitis develops in cases of secondary inflammation. Standard methods and medications for the treatment of sialadenosis lead to regression of clinical manifestations and remission. Usage of herbal extracts with prolonged action has a long-term local anti-inflammatory effect with minimal side effects, including those affecting oral mucosa. However, their use in the complex treatment of sialadenosis has been scarcely studied. Objective of our investigation was to estimate cytokine status dynamics in saliva from the parotid glands in the patients with sialadenosis and hypothyroidism during complex treatment which included the prolonged-action herbal remedy.

52 patients with sialadenosis of parotid salivary glands and hypothyroidism were divided into 2 groups: in the I group, 26 patients received basic therapy; in the II group, 26 patients received basic therapy + herbal drugs with prolonged effect as resorbable tablets. Control group consisted of 20 conditionally healthy people without disorders of parotid glands and thyroid gland. Comparative evaluation was performed 1 and 6 months after starting the treatment, with respect to clinical findings, sialometry and cytokine profile. The content of interleukins IL-1 β , IL-6, IL-10 and tumor necrosis factor (TNF) was determined in saliva of parotid glands by ELISA technique.

The 1st group of patients showed exacerbations within six months of basic treatment, and the sialometry data pointed to maintenance of decreased parotid function. In the 2nd group, when using basic treatment + herbal drugs, no clinical features of sialadenosis were evident within 6 months. The sialometry values were normalized, and the secretory function of the parotid glands was found to be increased. Therefore, it exerted an effect upon moisturization of oral mucosal and improvement quality of life in the patients. Regression of IL-1 β , IL-6 and TNF contents, and IL-10 increase in parotid gland secretions was significantly more pronounced at

the terms of 1 and 6 months in cases treated with herbal drugs, compared to Group 1, where a conventional protocol was used.

Addition of herbal drugs of prolonged action to the standard protocol of sialadenosis treatment is reasonable and effective.

Keywords: salivary glands, sialadenosis, sialadenitis, xerostomia, hyposalivation, hypothyroidism, cytokines, proinflammatory cytokines, IL-1 β , IL-6, TNF, anti-inflammatory IL-10 cytokine, herbal formulation

Введение

Сиаладеноз представляет собой дистрофическое заболевание паренхимы слюнных желез (СЖ) и сопровождается секреторными нарушениями и ее гипертрофией [3]. По данным ряда авторов, сиаладеноз встречается в 10-18% случаев среди заболеваний СЖ и поражает в основном околоушные слюнные железы (ОУСЖ) [4]. Профилактика и лечение сиаладеноза являются актуальными проблемами врача-стоматолога в связи с хронизацией процесса и увеличением числа пациентов [10].

Известно, что сиаладеноз возникает вследствие нейрогуморальных дисрегуляций на фоне общих соматических заболеваний организма [3]. Одним из таких патогенетических факторов является дисфункция щитовидной железы (ЩЖ) [2]. По данным Niedzinski E. и соавт., гипотиреоз способствует развитию гипертрофии больших слюнных желез (БСЖ) и снижению их секреции, что приводит к гипосаливации и ксеростомии [19]. Экспериментальные исследования свидетельствуют о том, что уже при субклиническом гипотиреозе наблюдается кистозная трансформация с лимфоидной инфильтрацией ткани в ОУСЖ, что характерно для сиаладеноза по паринхиматозному типу [16].

Доказано, что при снижении слюнообразования создаются условия для инфицирования протоков и ацинусов СЖ восходящей микрофлорой полости рта, что является причиной обострений воспалительного процесса (хронических сиаладенитов) и дальнейших органных нарушений. При этом отмечается повышение уровня провоспалительных цитокинов интерлейкина IL-1 β , IL-6 и фактора некроза опухоли- α (TNF) в секрете ОУСЖ [15]. Комплексное лечение больных сиаладенозом при гипотиреозе, направленное на нормализацию тиреоидного статуса, приводит только к временной ремиссии со стороны ОУСЖ. У пациентов часто наблюдается присоединение воспалительных явлений в виде сиаладенита, усиливается гипосаливация и сохраняется гипертрофия БСЖ [14].

На сегодняшний день использование терапевтических свойств активных компонентов растительных препаратов набирает популярность, так как антисептические и антибактериальные средства синтетического происхождения при длительном применении способствуют развитию аллергических реакций, дисбактериозу и отрицательно воздействуют на слизистую оболочку рта и ткани пародонта [1]. Никонов Г.К. и соавт. утверждают, что фитокомпозиции обладают сложным химическим составом и, следовательно, спектр их биологического действия достаточно широк [9]. Varghese J. и соавт. выявили *in vitro* снижение экспрессии IL-1 β , TNF и простагландина E2 (PGE2) в кератиноцитах слизистой оболочки рта под воздействием растительных экстрактов [21]. Min Y.D. и соавт., Saini P. и соавт. в своих работах доказали, что флавоноид кверцетин, входящий в состав календулы, снижает продукцию тучными клетками IL-1 β , IL-6, IL-8 и TNF [18, 20]. По данным Гончаровой Е.И. и соавт., препараты растительного происхождения способны оказывать патогенетическое, иммуномодулирующее действие, а фитотерапию можно использовать в составе аддитивной терапии [5, 8].

Широкое применение в терапевтических целях приобретают фитопрепараты отечественного производства. Они получены по уникальной технологии «противоточной сберегающей экстракции низкомолекулярных фракций водорастворимых биологически активных веществ лекарственных растений», которая позволяет выделять более 95% всех низкомолекулярных лечебных компонентов без балластных и вредных веществ, содержащихся в растениях [6, 7]. В связи с вышеизложенным представляется актуальным подбор оптимальной концентрации фитопрепарата в комплексной терапии и анализ изменений цитокинового профиля в качестве эффективности данного лечения.

Цель исследования — оценка цитокинового статуса в паротидном секрете больных сиаладенозом ОУСЖ с гипотиреозом на фоне комплексного лечения с применением препарата растительного происхождения пролонгированного действия.

Материалы и методы

На кафедре стоматологии ФГБУ ДПО «ЦГМА» УДП РФ и в отделении хирургической стоматологии и челюстно-лицевой хирургии ФГБУ «Поликлиники №1» УДП РФ в 2018–2021 гг. прошли обследование и лечение 52 пациента (42 женщин и 10 мужчин) с диагнозом «сиаладеноз ОУСЖ» (средний возраст $49,9 \pm 14,4$ лет). Исследование выполняли согласно Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» (WMA Declaration of Helsinki – Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects, 2013) и протоколу Конвенции совета Европы по правам человека и биомедицине 1999 г. Клиническое исследование одобрено Локальным Этическим Комитетом при ФГБУ ДПО «Центральная государственная медицинская академия» УДП РФ. Пациенты, включенные в исследование, подписывали добровольное информированное согласие.

Критериями включения были больные сиаладенозом ОУСЖ с ранее диагностированным гипотиреозом, которые наблюдались у врача-эндокринолога и получали гормон-заместительную терапию L-тироксин.

Критерии не включения: наличие в анамнезе злокачественных новообразований, лимфо-пролиферативных заболеваний, аутоиммунных процессов, сахарного диабета, метаболического синдрома, заболеваний мочеполовой системы, желудочно-кишечного тракта.

Диагноз «сиаладеноз ОУСЖ» был подтвержден на основе данных сиалометрии, УЗИ, и сиалографии.

В зависимости от метода лечения пациентов разделили на группы:

1-я – 26 человек (21 женщина и 5 мужчин) получали базовую терапию (средний возраст $49,5 \pm 14,3$ лет); 2-я – 26 больных (21 женщина и 5 мужчин) лечили базовой терапией + фитопрепарат местного пролонгированного действия (средний возраст $50,3 \pm 14,1$ лет).

В контрольную группу сравнения вошли 20 сопоставимых по полу и возрасту практически здоровых индивидуумов (11 женщин и 9 мужчин, средний возраст – $41,6 \pm 5,7$), у которых предварительно были исключены патологии полости носа, рта, ротоглотки и воспалительные явления в челюстно-лицевой области.

При клиническом осмотре проводилась пальпация БСЖ, визуально оценивали увлажнен-

ность слизистой оболочки и количество выделяемого секрета из протоков ОУСЖ.

В 1-й группе базовое лечение заключалось в противовоспалительной терапии методикой, разработанной и предложенной проф. И.Ф. Ромачевой (1973): 1) проведение наружных 0,5%-ных новокаиновых блокад по А.В. Вишневскому в области ОУСЖ в количестве 15–20 мл, курсом 5 блокад, чередуя с компрессами 30%-ным раствором диметилсульфоксида, разведенным в соотношении 1:3; 2) бужирование устья Стенонового протока зондами Боумана; 3) инстиляция протоков железы физиологическим раствором (0,9% NaCl) до чистых промывных вод; 4) препарат, содержащий комплекс протеолитических ферментов (панкреатин, папаин, рутозида тригидрат, бромелаин, трипсин, липаза, амилаза, химотрипсин), *per os* по 3 таблетки 3 раза в день в течение 2 недель.

Во 2-й группе указанную терапию сочетали с фитопрепаратом на основе лиофилизированного водорастворимого экстракта лекарственных растений: календулы, тысячелистника, зверобоя, корня солодки, плодов шиповника, также содержащих пектин, флавоноиды, витамин С (Россия). Таблетки фиксировались на слизистой оболочке твердого неба и рассасывались более трех часов, применялись по 2 раза в сутки. Курс длился 21 день.

На этапе диагностики, через 1 и 6 месяцев после лечения, пациентам проводилась сиалометрия с целью динамического наблюдения за функциональным состоянием ОУСЖ (рис. 1А, см. 2-ю стр. обложки). Паротидную слюну собирали утром натощак при помощи двухкамерной капсулы Лешли–Ющенко–Красногорского, в модификации Л. Сазама, по методу М.В. Симоновой (1982). В дальнейшем секрет ОУСЖ, собранный в градуированную пробирку, помещали в морозильный контейнер и доставляли в специальной переносной камере в лабораторию экспериментальной и клинической фармакологии ФГБУ НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева МЗ РФ для оценки цитокинового статуса (рис. 1Б, см. 2-ю стр. обложки).

Содержание IL-1 β , IL-6, IL-10 и TNF определяли в образцах слюны ОУСЖ иммуноферментным анализом (ИФА) с использованием реактивов фирмы «Вектор-бест» (Россия). Перед лабораторным исследованием проводилось быстрое размораживание образцов. Пробирки центрифугировали при 10000 g в течение 10 минут. В дальнейшем работали с супернатантом. Для учета результатов использовали прибор BMG Labtech, ClarioStar (Германия) со спектром волн

в диапазоне 220–1000 нм с разрешением 1–10 нм. Для стандартизации определяли пироголовым методом количество общего белка в супернатанте (мг/мл). Затем пересчитывали содержание цитокинов на концентрацию белка 1 мг/мл. Все расчетные показатели содержания белка цитокинов описаны в пг/мл (pg/ml), с учетом общего уровня белка в надосадочной жидкости.

Статистическая обработка данных проводилась с использованием программы STATISTICA 13.0 (StatSoft, США). Все количественные признаки тестировали на соответствие их распределения нормальному критерию Колмогорова. Параметрические данные описаны в виде среднего значения и среднего квадратичного отклонения. Вычисляли t-критерий Стьюдента для независимых выборок, уровень достоверности (p). Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

Результаты

На этапе комплексного обследования пациенты обеих групп 30 (58%) человек жаловались на сухость в полости рта, 15 (29%) ощущали болезненное увеличение ОУСЖ, 5 (9%) больных отмечали наличие солоноватого привкуса слюны, а у 2 (4%) были сочетанные жалобы. У всех пальпировались увеличенные ОУСЖ, в 30 случаях (58%) они были мягко-эластичной консистенции и безболезненные, а в 22 (42%) – плотные и болезненные. При клиническом осмотре у 30 (58%) больных сиаладенозом наблюдались симптомы гипосаливации: либо выраженная сухость слизистых оболочек, либо наличие вязкой и пенистой слюны. У остальных 22 (42%) пациентов визуализировалась бледно-розового цвета и умеренно увлажненная или гиперемизованная и слабо увлажненная слизистая оболочка рта. Из протока ОУСЖ выделялся мутный секрет с фибринозными включениями у 17 (33%) исследуемых. Среднее значение сиалометрии было равно $1,29 \pm 0,5$ мл и интерпретировалось как II степень ксеростомии (рис. 2, см. 2-ю стр. обложки).

Уровень провоспалительных цитокинов в паротидном секрете больных сиаладенозом ОУСЖ был выше контрольных значений: IL-1 β – в 2,7 раза ($15,02 \pm 4,16$ vs $5,61 \pm 0,86$ пг/мл, $p = 0,03$), IL-6 – в 2,5 раза ($22,2 \pm 2,79$ vs $8,76 \pm 1,93$ пг/мл, $p = 0,0002$), TNF – в 18,6 раза ($3,16 \pm 0,93$ vs $0,17 \pm 0,077$ пг/мл, $p = 0,002$). Содержание противовоспалительного цитокина IL-10 в паротидной слюне составило $12,2 \pm 1,9$ пг/мл, что достоверно ниже контрольной группы – $16,8 \pm 0,47$ пг/мл ($p = 0,02$, табл. 1).

Добровольцы, составляющие контрольную группу сравнения ($n = 20$), в момент осмотра не предъявляли жалоб. ОУСЖ у них не контурировались и не пальпировались. Слизистая оболочка рта определялась бледно-розового цвета, умеренно увлажненной. Выделялся прозрачный секрет из протоков ОУСЖ. Данные сиалометрии составляли $3,92 \pm 0,56$ мл, что свидетельствовало о нормальной секреторной функции СЖ. В паротидной слюне выявленные цитокины IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF были приняты как пороговые значения. При этом TNF был обнаружен только у 25% обследуемых (5 человек).

Через месяц после проведения базовой терапии в 1-й группе все больные отметили субъективное улучшение состояния: у всех пациентов отсутствовали боль в околоушно-жевательной области и солоноватый привкус во рту. ОУСЖ при пальпации были безболезненными, мягко-эластичной консистенции, но оставались увеличенными у 5 (19%) пациентов. Слизистая оболочка рта визуализировалась бледно-розового цвета и умеренно увлажненная у 21 (81%) человека, гиперемизованная и без свободной слюны – у 5 (19%) человек. Из устья протоков желез получали каплю чистого секрета. Функциональная активность ОУСЖ оставалась сниженной, так как средний показатель сиалометрии был равен $2,0 \pm 0,4$ мл (ксеростомия I степени). Уровень провоспалительных цитокинов (табл. 1) снизился в сравнении с I визитом: IL-1 β – в 1,7 раза ($9,1 \pm 1,55$ vs $15,02 \pm 4,16$ пг/мл, $p = 0,19$), IL-6 – в 1,3 раза ($17,2 \pm 2,10$ vs $22,2 \pm 2,79$ пг/мл, $p = 0,16$), TNF – в 2,6 раза ($1,2 \pm 0,35$ vs $3,16 \pm 0,93$ пг/мл, $p = 0,05$). Однако их концентрация все также оставалась выше чисел контрольной группы: IL-1 β – в 1,6 раза ($p = 0,06$), IL-6 – в 2 раза ($p = 0,005$), TNF – в 7 раз ($p = 0,006$). Противовоспалительный IL-10 увеличился в 1,1 раза без достоверной разницы с начальным уровнем ($13,1 \pm 0,9$ vs $12,2 \pm 1,9$ пг/мл, $p = 0,67$). Статистические различия показывают, что все показатели достоверно отличались от цифр контрольной группы, что свидетельствует о сохранении воспалительного процесса в ОУСЖ и таким образом подтверждает, что базового курса терапии для достижения полной ремиссии было недостаточно.

Во 2-й группе через 1 месяц после применения фитопрепарата и прохождения курса базовой терапии у всех пациентов также отсутствовали жалобы. При пальпации ОУСЖ были мягко-эластичной консистенции, безболезненные в 100% случаев. У всех пациентов слизистая оболочка рта была умеренно увлажнена и из протока ОУСЖ получали прозрачный секрет. Средние

ТАБЛИЦА 1. СРЕДНИЕ ЗНАЧЕНИЯ УРОВНЕЙ ЦИТОКИНОВ В ПАРОТИДНОМ СЕКРЕТЕ ПАЦИЕНТОВ С СИАЛАДЕНОЗОМ ОУСЖ

TABLE 1. AVERAGE VALUES OF CYTOKINE LEVELS IN SALIVA OF PAROTID GLANDS OF PATIENTS WITH SIALADENOSIS

Группы Groups		Цитокины, пг/мл Cytokines, pg/ml			
		IL-1 β	IL-6	TNF	IL-10
Контрольная группа Control group (n = 20)		5,61 $\pm$ 0,86	8,76 $\pm$ 1,93	0,170 $\pm$ 0,077	16,80 $\pm$ 0,47
До лечения Before treatment (n = 52)		15,02 $\pm$ 4,16*	22,20 $\pm$ 2,79*	3,16 $\pm$ 0,93*	12,2 $\pm$ 1,9*
Через 1 месяц после лечения 1 month after treatment	1-я группа 1 st group (n = 26)	9,10 $\pm$ 1,55	17,20 $\pm$ 2,10*	1,20 $\pm$ 0,35*	13,1 $\pm$ 0,9*
	2-я группа 2 nd group (n = 26)	5,40 $\pm$ 0,77**	9,55 $\pm$ 2,01* **	0,80 $\pm$ 0,13*	15,83 $\pm$ 1,01**
Через 6 месяцев после лечения 6 months after treatment	1-я группа 1 st group (n = 26)	10,31 $\pm$ 1,07*	19,5 $\pm$ 1,8*	2,60 $\pm$ 0,82*	13,0 $\pm$ 1,1*
	2-я группа 2 nd group (n = 26)	5,80 $\pm$ 0,65**	9,6 $\pm$ 1,3**	0,8 $\pm$ 0,3* **	16,10 $\pm$ 1,03**

Примечание. * – достоверность различий между группами пациентов и группой сравнения, $p < 0,05$; ** – достоверность различий между 1-й и 2-й группой, $p < 0,05$.

Note. *, significance of differences between the main groups and the comparison group, $p < 0.05$; **, significance of differences between the 1st group and the 2nd group, $p < 0.05$.

показатели сиалометрии улучшились и достигли нижней границы нормы $2,6 \pm 0,5$ мл. При анализе провоспалительных цитокинов (табл. 1) выявилось, что после присоединения фитопрепарата к базовой терапии во 2-й группе IL-1 β снизился в 1,7 раза по сравнению с 1-й группой пациентов ($9,1 \pm 1,55$ vs $5,4 \pm 0,77$ пг/мл, $p = 0,04$) и статистически не различался с группой сравнения ($p = 0,86$). Аналогичная ситуация наблюдалась с IL-6: цитокин снизился в 1,8 раз, что также достоверно различалось с 1 группой ($17,2 \pm 2,10$ vs $9,55 \pm 2,01$ пг/мл, $p = 0,01$) и был близок значениям контрольной группы ($p = 0,78$). TNF во 2-й группе снизился в 1,5 раза по сравнению с 1-й ($1,2 \pm 0,35$ vs $0,8 \pm 0,13$ пг/мл, $p = 0,29$), но при этом он был выше значений группы здоровых добровольцев в 4,7 раза ($p = 0,0001$). IL-10 при лечении с фитопрепаратом увеличился 1,2 раза, был выше показателей 1-й группы ($13,1 \pm 0,9$ vs $15,83 \pm 1,01$ пг/мл, $p = 0,049$) и достоверно не отличался от группы сравнения ($p = 0,39$). Графическая интер-

претация сравнительных данных представлена на рисунке 3.

Через 6 месяцев после проведенного лечения в 1-й группе у 2 человек (8%) наблюдалось обострение воспалительного процесса в ОУСЖ, которое сопровождалось жалобами на боль и припухлость в околоушно-жевательной области. Из протоколов ОУСЖ этих 2 пациентов получали мутный секрет с включениями, у 5 человек (19%) из 26 исследуемых выделялся прозрачный вязкий секрет. Средний уровень сиалометрии незначительно снизился $1,8 \pm 0,35$ мл. Концентрация провоспалительных цитокинов незначительно увеличилась без статистической разницы в сравнении с периодом через 1 месяц после лечения: IL-1 β – в 1,1 раза ($9,1 \pm 1,55$ vs $10,31 \pm 1,07$ пг/мл, $p = 0,52$), IL-6 – в 1,1 раза ($17,2 \pm 2,10$ vs $19,5 \pm 1,8$ пг/мл, $p = 0,41$) TNF – в 2,2 раза ($1,2 \pm 0,35$ vs $2,6 \pm 0,82$ пг/мл, $p = 0,12$). Количество IL-10 оставалось на уровне показателя этого цитокина через 1 месяц после окончания терапии – $13,1 \pm 0,9$ vs $13,0 \pm 1,1$ пг/мл, $p = 0,94$ (рис. 4).

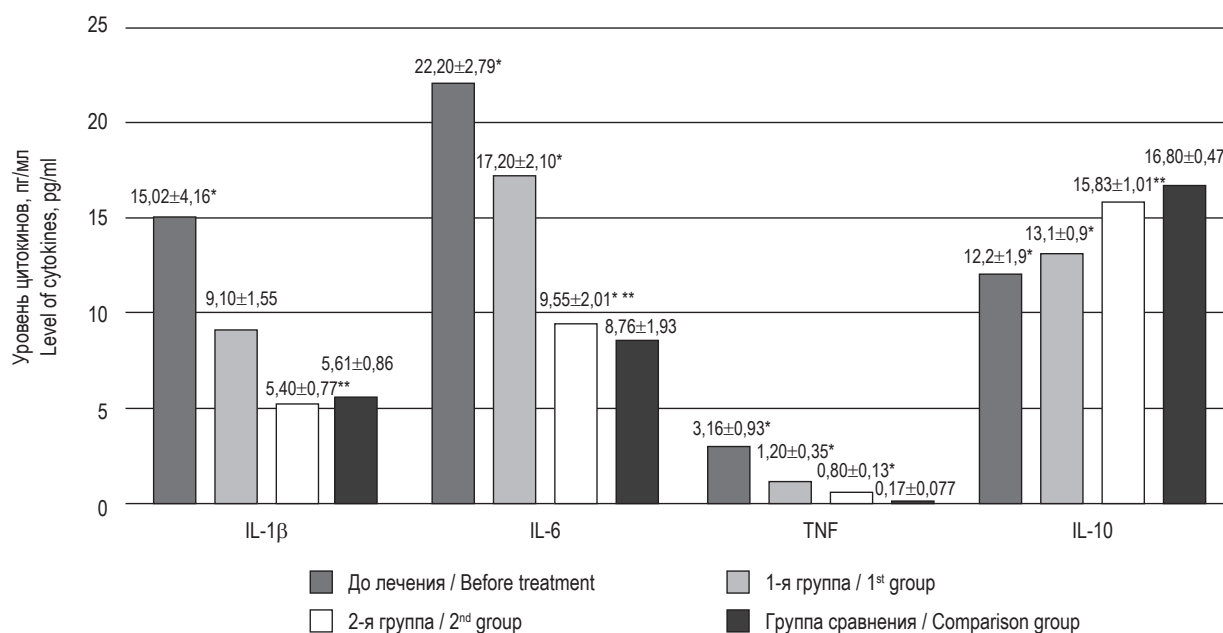


Рисунок 3. Уровень цитокинов в паротидном секрете пациентов с сиаладенозом ОУСЖ до лечения и через один месяц после лечения

Примечание. * – достоверность различий между группами пациентов и группой сравнения, $p < 0,05$; ** – достоверность различий между 1-й и 2-й группой, $p < 0,05$.

Figure 3. Level of cytokines in the saliva of the parotid glands of patients with sialadenosis before treatment and a month after treatment

Note. *, significance of differences between the main groups and the comparison group, $p < 0.05$; **, significance of differences between the 1st group and the 2nd group, $p < 0.05$

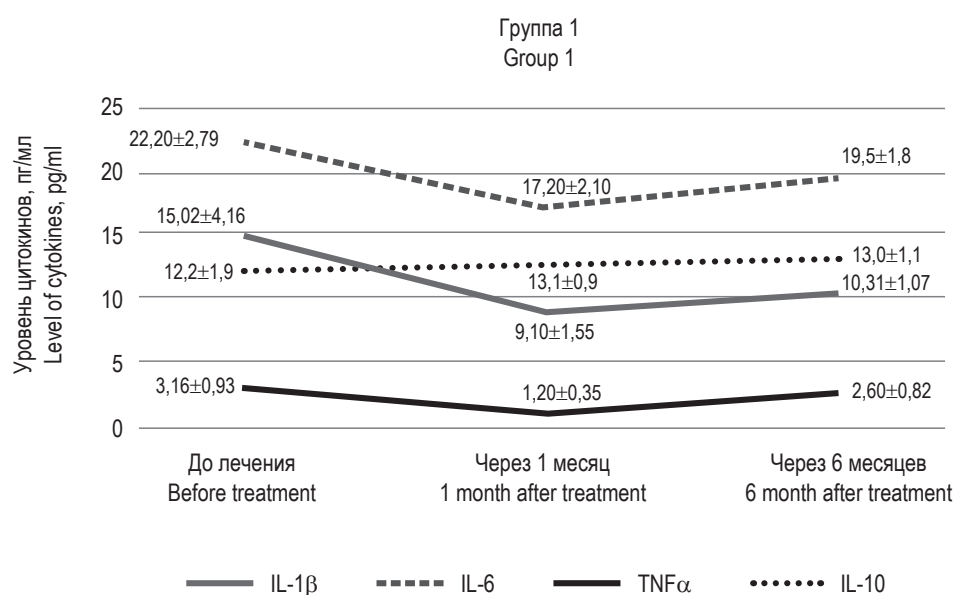


Рисунок 4. Динамика уровня цитокинов в паротидном секрете пациентов с сиаладенозом ОУСЖ в 1-й группе

Figure 4. Dynamics of cytokines level in the saliva of the parotid glands of patients with sialadenosis in group 1

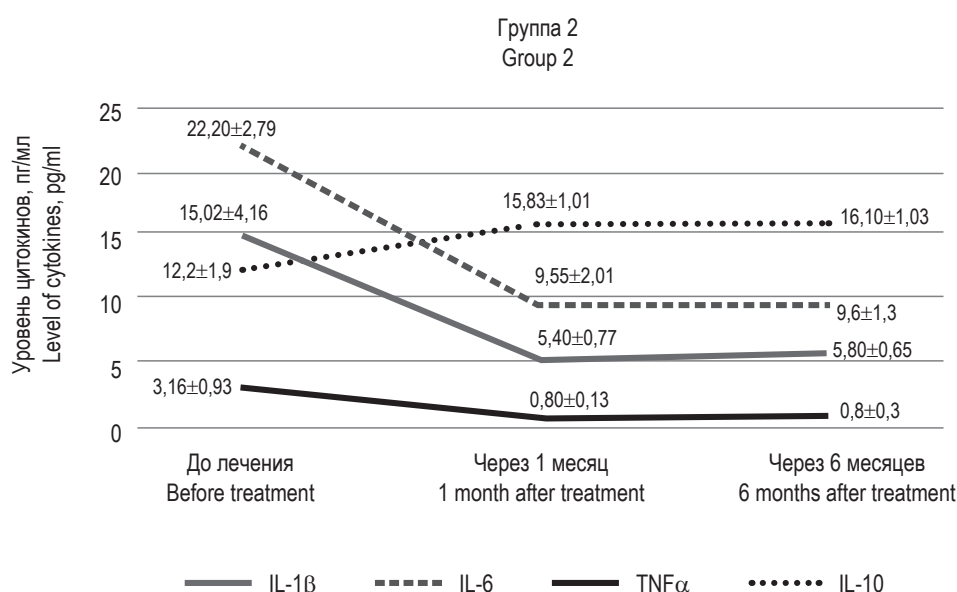


Рисунок 5. Динамика уровня цитокинов в паротидном секрете пациентов с сиаладенозом ОУСЖ во 2-й группе

Figure 5. Dynamics of cytokines level in the saliva of the parotid glands of patients with sialadenosis in group 2

Во 2-й группе в течение полугода после лечения обострения не фиксировались. У всех пациентов ОУСЖ не пальпировались, из устья протока желез получали прозрачный секрет. Сиалометрия соответствовала нижней границе нормы и равнялась $2,6 \pm 0,41$ мл. Достоверной разницы между про- и противовоспалительными цитокинами по сравнению с данными, полученными через 1 месяц после окончания лечения, во 2-й группе не выявлено (рис. 5). Напротив, по сравнению с результатами всех исследуемых цитокинов через 6 месяцев в 1-й группе по всем показателям получена статистически значимая разница: IL-1β в 1,8 раза ниже ($10,31 \pm 1,07$ vs $5,8 \pm 0,65$ пг/мл, $p = 0,0007$), IL-6 – в 2 раза ($19,5 \pm 1,8$ vs $9,6 \pm 1,3$ пг/мл, $p = 0,00005$), TNF – в 3,25 раза ($2,6 \pm 0,82$ vs $0,8 \pm 0,3$ пг/мл, $p = 0,04$) и IL-10 был выше в 1,2 раза ($13,0 \pm 1,1$ vs $16,1 \pm 1,03$ пг/мл, $p = 0,045$).

Обсуждение

Сиаладенозы определяются как заболевание невоспалительной и неопухолевой природы, характеризующиеся структурными изменениями тканей слюнной железы с увеличением количества ацинарных клеток, секреторных гранул, дегенеративными изменениями миоэпителиальных клеток и постганглионарных симпатических нервов, которые обычно появляются на фоне многих системных патологических процессов, эндокринных, нейрогенных и метаболических

расстройств. Эти дистрофические процессы могут осложняться присоединением воспалительных процессов, приводящие к сиаладенитам. Клиническая картина сиаладеноза неспецифична, чаще всего пациентов беспокоит увеличение ОУСЖ с 2 сторон, иногда их болезненность при пальпации и ксеростомия или сухость во рту [17].

Предлагаются различные варианты для лечения сиаладеноза, что говорит об отсутствии единого эффективного подхода к их терапии и неполном понимании патофизиологических механизмов их развития. Важно устранить первопричину, которая привела к развитию сиаладеноза. А непосредственно их лечение на сегодняшний день заключается в симптоматической терапии. Моментом выздоровления считается регресс воспалительных явлений и клинических проявлений заболевания. Считается, что процесс трансформируется в состояние ремиссии длительностью 6-12 месяцев.

Поскольку отсутствуют валидные лабораторные показатели, подтверждающие явления сиаладенита в ОУСЖ, локальное определение цитокинов в слюне из ОУСЖ в процессе лечения позволяет составить более объективное мнение о состоянии этой слюнной железы и динамики течения воспалительного процесса. Общепринято, что измерение показателей системного иммунитета при воспалительных процессах челюстно-лицевой области для определения тактики ведения и лечения пациентов нецелесообразно, а

наиболее информативным в этом случае является изучение параметров именно локального иммунного статуса [11, 12].

В предыдущем исследовании мы определили, что содержание IL-1 β , IL-6, TNF в секрете ОУСЖ пациентов с сиаладенозами на фоне гипотиреоза в ремиссии и стадии обострения было выше контрольных значений. Показатели при хронических воспалительных процессах в железах были в несколько раз выше, чем при дистрофическом заболевании ОУСЖ. Однако IL-10 показывал обратную связь между группами [15]. Для оценки динамики состояния ОУСЖ после проведенных схем лечения мы взяли аналогичный набор цитокинов. Под действием провоспалительного цитокина IL-1 β начинается усиленный хемотаксис ключевых клеток, участвующих в воспалительном процессе, активируется процесс фагоцитоза и перекисного окисления липидов, IL-6 вызывает пролиферацию Т- и В-лимфоцитов, индуцирует синтез IL-2, усиливает функциональную активность NK (натуральных киллеров), а TNF активизирует нейтрофилы и макрофаги, участвует в их хемотаксисе в зону воспаления, что приводит к усилению воспалительной реакции. В противовес IL-10 является активным супрессором продукции провоспалительных цитокинов и реактивных форм кислорода Th1-лимфоцитами, макрофагами и антигенпрезентирующими клетками, ингибирует представление антигена и фагоцитоз [11, 13].

Изучение локального цитокинового статуса в секрете ОУСЖ выявило, что на фоне базового лечения в 1-й группе через месяц после окончания курса отмечался регресс всех провоспалительных цитокинов, но в то же время они оставались выше уровня контрольной группы. Одновременно наблюдалось незначительное увеличение IL-10. Через 6 месяцев статистической разницы концентрации IL-1 β , IL-6, TNF, IL-10 по сравнению с показателями через 1 месяц после окончания терапии не было выявлено. Все значения отличались от группы контроля, что свидетельствует о поддержании минимальной воспалительной активности в ОУСЖ, несмотря на отсутствие клинических проявлений, и хронизации воспалительного процесса. Таким образом, стандартной базовой терапии недостаточно до достижения ремиссии воспаления. Это утверждение дополняли рецидивы сиаладенита в 8% и изменения в секрете ОУСЖ при осмотре и сиаламетрии.

Во 2-й группе после комплексного лечения с фитопрепаратом через 1 месяц после окончания лечения в секрете ОУСЖ отмечалось более выраженное снижение количества всех провоспали-

тельных цитокинов по сравнению с 1-й группой. При этом уровень IL-1 β был равен, а IL-6, TNF α были достоверно выше нормативных значений контрольной группы. Количество противовоспалительного цитокина IL-10 также достигло показателей группы контроля и было статистически значимо выше по сравнению с 1-й группой. Через 6 месяцев после окончания курса лечения в цитокиновом статусе секрета ОУСЖ сохранялась аналогичная картина. Выявлены повышенные показатели IL-6, TNF по сравнению с группой контроля и нормальные значения IL-1 β и IL-10. Все исследуемые провоспалительные цитокины были достоверно ниже, а IL-10 достоверно выше показателей 1-й группы. При клиническом осмотре ОУСЖ не пальпировались, были безболезненными. Секреторная функция ОУСЖ улучшилась: слизистая оболочка рта оставалась увлажненной, средние данные сиаламетрии повысились на 50%. Это свидетельствует о положительной динамике, более быстрой тенденции к регрессу воспалительного процесса в СЖ и большей эффективности этого протокола лечения.

Учитывая вышесказанное, дополнительное применение фитопрепарата местного действия к базовой терапии за счет длительного нахождения в полости рта в процессе рассасывания оказывало положительный субъективный увлажняющий эффект слизистой оболочки рта и дополнительное локальное противовоспалительное действие за счет пролонгированного высвобождения активных веществ, входящих в состав препарата. Поэтому дальнейший поиск дополнительных местных противовоспалительных средств, в том числе растительного происхождения, для лечения сиаладеноза позволит достигать полной и длительной ремиссии воспалительного процесса в ОУСЖ.

Заключение

Включение фитопрепарата пролонгированного действия в комплексное лечение показало достоверно более высокий уровень регресса IL-1 β , IL-6 и TNF и повышение IL-10 в секрете ОУСЖ по сравнению с 1-й группой, где применялся традиционный протокол через 1 и 6 месяцев после проведенного лечения. Дополнительно в группе с фитопрепаратом выявлено усиление секреторной функции ОУСЖ, что приводило к лучшему увлажнению слизистой оболочки рта.

Таким образом, полученные результаты показали, что дополнение базовой терапии сиаладеноза на фоне гипотиреоза фитопрепаратом длительного рассасывания повышает эффективность лечения и является целесообразным.

Список литературы / References

1. Абдурахманова С.А., Рунова Г.С., Подпорин М.С., Царева Е.В., Ипполитов Е.В., Царев В.Н. Микробиологическое обоснование применения фитопрепаратов для лечения воспалительных заболеваний пародонта // Пародонтология, 2019. Т. 24, № 3. С. 196-202. [Abdurakhmanova S.A., Runova G.S., Podporin M.S., Tsareva E.V., Ippolitov E.V., Tsarev V.N. Microbiological substantiation of application of phytopreparations in treatment of inflammatory periodontal diseases. *Parodontologiya = Parodontologiya*, 2019, Vol. 24, no. 3, pp. 196-202. (In Russ.)]
2. Абусуев С.А., Асиятилов А.Х., Ордашев Х.А. Содержание тироксина и тиреотропного гормона в слюне и сыворотке крови у больных сиалопатиями на фоне заболеваний щитовидной железы // Вестник новых медицинских технологий, 2008. Т. XV, № 2. С. 176-177. [Asytilov G.A., Abusuev S.A., Asiyatlov A.Kh. Thyroxin and thyreotropic hormon content in saliva and blood serum in patients with sialopathies on background of thyroid gland disease. *Vestnik novykh meditsinskikh tekhnologiy = Journal of New Medical Technologies*, 2008, Vol. 15, no. 2, pp. 176-177. (In Russ.)]
3. Афанасьев В.В., Абдусаламов М.Р. Заболевания, травмы и пороки развития слюнных желез. М.: ГЭ-ОТАР-Медиа, 2016. 240 с. [Afanasyev V.V., Abdusalamov M.R. Diseases, injuries and malformations of the salivary glands]. Moscow: GEOTAR-Media, 2016. 240 p.
4. Афанасьев В.В., Хубутия Б.Н., Винокурова О.Ю., Денисова Е.И. Структура заболеваемости СЖ по данным Всероссийского Центра по изучению заболеваний СЖ на базе клиники хирургической стоматологии челюстно-лицевого госпиталя Ветеранов Войн департамента здравоохранения г. Москвы // Российский стоматологический журнал, 2012. № 6. С. 36-37. [Afanasyev V.V., Khubutia B.N., Vinokurova O.Yu., Denisova E.I. Structure of morbidity of the salivary glands according to the data of the all-russian center for the study of diseases of the salivary glands on the basis of the clinic dental surgery maxillo-facial hospital of War veterans of the Department of healthcare of Moscow. *Rossiyskiy stomatologicheskii zhurnal = Russian Journal of Dentistry*, 2012, no. 6, pp. 36-37. (In Russ.)]
5. Гончарова Е.И. Растительные средства в профилактике и лечении заболеваний пародонта // Российский стоматологический журнал, 2012. № 3. С. 48-52. [Goncharova E.I. The use of the herbal medicinal products for the prevention and treatment of periodontal diseases. *Rossiyskiy stomatologicheskii zhurnal = Russian Journal of Dentistry*, 2012, no. 3, pp. 48-52. (In Russ.)]
6. Мануйлов Б.М. Клиническое применение инновационных фитопрепаратов в стоматологии и челюстно-лицевой хирургии // Новое в стоматологии, 2017. № 6. С. 40-43. [Manujlov B.M. Clinical application of innovative herbal drugs in dentistry and maxillofacial surgery. *Novoe v stomatologii = New in Dentistry*, 2017, no. 6, pp. 40-43. (In Russ.)]
7. Мануйлов Б.М., Леонтьев В.К. Некоторые научно-практические обоснования высокой терапевтической эффективности инновационных фитопрепаратов в медицине // Новое в стоматологии, 2017. № 4. С. 44-48. [Manujlov B.M., Leontyev V.K. Some scientific and practical substantiation of the high therapeutic effectiveness of innovative herbal drugs in medicine. *Novoe v stomatologii = New in Dentistry*, 2017, no. 4, pp. 44-48. (In Russ.)]
8. Михайлова А.Б., Горбатова Е.А., Вавилова Т.П., Мануйлов Б.М. Инновационные препараты растительного происхождения в комплексном лечении катарального гингивита // Маэстро стоматологии, 2013. № 1. С. 74-77. [Mikhaylova A.B., Gorbatova E.A., Vavilova T.P., Manuylov B.M. Innovative herbal preparations in the complex treatment of catarrhal gingivitis. *Maestro stomatologii = Maestro of Dentistry*, 2013, no. 1, pp. 74-77. (In Russ.)]
9. Никонов Г.К., Мануйлов Б.М. Основы современной фитотерапии. М.: Медицина, 2005. 520 с. [Nikonov G.K., Manuylov B.M. Fundamentals of modern herbal medicine]. Moscow: Medicine, 2005. 520 p.
10. Рунова М.Б. Современные принципы диагностики и лечения заболеваний слюнных желез // Современные технологии в медицине, 2011. № 3. С. 152-156. [Runova M.B. Present-day principles of diagnosis and treatment of salivary gland diseases. *Sovremennye tekhnologii v meditsine = Modern Technologies in Medicine*, 2011, no. 3, pp. 152-156. (In Russ.)]
11. Савлевич Е.Л., Симбирцев А.С., Чистякова Г.Н., Терехина К.Г., Бацкалевич Н.А. Состояние системного и местного иммунитета при острых назофарингитах на фоне ОРВИ // Терапия, 2021. № 4. С. 57-63. [Savlevich E.L., Simbirtsev A.S., Chistyakova G.N., Terekhina K.G., Batskalevich N.A. The state of systemic and local immunity in acute nasopharyngitis with ARVI. *Terapiya = Therapy*, 2021, no. 4, pp. 57-63. (In Russ.)]
12. Савлевич Е.Л., Хайдуков С.В., Курбачева О.М., Бондарева Г.П., Шачнев К.Н., Симбирцев А.С. Показатели клеточного иммунитета пациентов с хроническим полипозным риносинуситом // Медицинская иммунология, 2017. Т. 19, № 6. С. 731-738. [Savlevich E.L., Khaidukov S.V., Kurbacheva O.M., Bondareva G.P., Shachnev K.N., Simbirtsev A.S. Characteristics of cellular immune status in the patients with chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2017, Vol. 19, no. 6, pp. 731-738. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2017-6-731-738.

13. Симбирцев А.С. Цитокины в патогенезе и лечении заболеваний человека. СПб.: Фолиант, 2018. 512 с. [Simbirtsev A.S. Cytokines in the pathogenesis and treatment of human diseases]. St. Petersburg: Foliant, 2018. 512 p.
14. Сульимова Т.Б., Козлова М.В. Заболевания слюнных желез при эндокринопатиях // Вестник КГМА имени И.К. Ахунбаева, 2020. № 2. С. 79-86. [Sultimova T.B., Kozlova M.V. Diseases of the salivary glands with endocrinopathy. *Vestnik KGMA imeni I.K. Akhunbaeva = Journal of Kyrgyz State I. Akhunbaev Medical Academy*, 2020, no. 2, pp. 79-86. (In Russ.)]
15. Сульимова Т.Б., Козлова М.В., Гапонов А.М., Савлевич Е.Л., Козлов И.Г. Локальный цитокиновый статус у пациентов с сиаладенозом околоушной слюнной железы на фоне гипотиреоза // Иммунология, 2021. Т. 42, № 4. С. 356-363. [Sultimova T.B., Kozlova M.V., Gaponov A.M., Savlevich E.L., Kozlov I.G. Local cytokine status in patients with sialadenosis of parotid glands with hypothyroidism. *Immunologiya = Immunologiya*, 2021, Vol. 42, no. 4, pp. 356-363. (In Russ.)]
16. Сульимова Т.Б., Козлова М.В., Мкртумян А.М. Влияние патологии щитовидной железы на развитие сиаладенозов // Кремлевская медицина. Клинический вестник, 2018. Т. 2, № 4. С. 47-51. [Sultimova T.B., Kozlova M.V., Mkrtumyan A.M. The effect of thyroid pathology on the development of diseases of the large salivary glands. *Kremlevskaya meditsina. Klinicheskiy vestnik = Kremlin Medicine. Clinical Bulletin*, 2018, Vol. 2, no. 4, pp. 47-51. (In Russ.)]
17. Davis A.B., Hoffman H.T. Management options for sialadenosis. *Otolaryngol. Clin. North Am.*, 2021, Vol. 54, no. 3, pp. 605-611.
18. Min Y.D., Choi C.H., Bark H., Son H.Y., Park H.H., Lee S., Park J.W., Park E.K., Shin H.I., Kim S.H. Quercetin inhibits expression of inflammatory cytokines through attenuation of NF-kappaB and p38 MAPK in HMC-1 human mast cell line. *Inflamm. Res.*, 2007, Vol. 56, no. 5, pp. 210-215.
19. Niedzinski E.J., Chen Y.J., Olson D.C., Parker E.A., Park H., Udove J.A., Scollay R., McMahon B.M., Bennett M.J. Enhanced systemic transgene expression after nonviral salivary gland transfection using a novel endonuclease inhibitor/DNA formulation. *Gene Ther.*, 2003, Vol. 10, no. 26, pp. 2133-2138.
20. Saini P., Al-Shibani N., Sun J., Zhang W., Song F., Gregson K.S., Windsor L.J. Effects of *Calendula officinalis* on human gingival fibroblasts. *Homeopathy*, 2012, Vol. 101, no. 2, pp. 92-98.
21. Varghese J., Ramenzoni L.L., Shenoy P., Nayak U.Y., Nayak N., Attin T., Schmidlin P.R. *In vitro* evaluation of substantivity, staining potential, and biofilm reduction of guava leaf extract mouth rinse in combination with its anti-inflammatory effect on human gingival epithelial keratinocytes. *Materials (Basel)*, 2019, Vol. 12, no. 23, 3903. doi: 10.3390/ma12233903.

Авторы:

Сульимова Т.Б. — ассистент кафедры стоматологии ФГБУ ДПО «Центральная государственная медицинская академия» Управления делами Президента Российской Федерации, Москва, Россия

Козлова М.В. — д.м.н., профессор, заведующая кафедрой стоматологии ФГБУ ДПО «Центральная государственная медицинская академия» Управления делами Президента Российской Федерации, Москва, Россия

Гапонов А.М. — к.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярных механизмов критических состояний ФГБУН «Научно-исследовательский институт общей реаниматологии имени В.А. Неговского», Москва, Россия

Authors:

Sultimova T.B., Assistant Professor, Department of Stomatology, Central State Medical Academy, Department for Presidential Affairs of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation

Kozlova M.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Stomatology, Central State Medical Academy, Department for Presidential Affairs of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation

Gaponov A.M., PhD (Medicine), Leading Research Associate, Laboratory of Molecular Mechanisms of Critical Conditions, V. Negovsky Research Institute of General Resuscitation, Moscow, Russian Federation

Савлевич Е.Л. — д.м.н., доцент кафедры оториноларингологии ФГБУ ДПО «Центральная государственная медицинская академия» Управления делами Президента Российской Федерации, Москва, Россия

Savlevich E.L., PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Department of Otolaryngology, Central State Medical Academy, Department for Presidential Affairs of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation

Козлов И.Г. — д.м.н., профессор кафедры организации и управления в сфере обращения лекарственных средств ДПО ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ (Сеченовский университет); профессор кафедры клинической иммунологии и аллергологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Kozlov I.G., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Management and Turnover of Medical Drugs, I. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University); Professor, Department of Clinical Immunology and Allergy, D. Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Moscow, Russian Federation

Поступила 30.01.2022
Принята к печати 13.02.2022

Received 30.01.2022
Accepted 13.02.2022

ИССЛЕДОВАНИЕ ЛОКАЛЬНОГО ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ОТВЕТА ПРИ РАЗНЫХ ФОРМАХ ХРОНИЧЕСКОГО ПОЛИПОЗНОГО РИНОСИНУСИТА

Варюшина Е.А.¹, Безрукова Е.В.², Воробейчиков Е.В.³,
Кравченко Э.В.², Сухарева Ю.В.², Афлитонов М.А.⁴, Симбирцев А.С.^{5,6}

¹ ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

² ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова», Санкт-Петербург, Россия

³ ООО «Полифарм», Санкт-Петербург, Россия

⁴ ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта», г. Калининград, Россия

⁵ ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» Федерального медико-биологического агентства России, Санкт-Петербург, Россия

⁶ ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Хронический риносинусит (ХРС) — заболевание, от которого страдают 5-12% взрослого населения в мире. Из всех случаев ХРС, 25-30% составляет хронический полипозный риносинусит (ХПРС). Течение воспалительного процесса в слизистой оболочке носа и околоносовых пазух при ХПРС во многом определяется особенностями местного иммунитета. Цель данной работы — исследовать параметры местного иммунитета при различных формах ХПРС. В работе были изучены концентрации провоспалительных цитокинов интерлейкина-1 β (IL-1 β) и IL-8, показатели антимикробной функции нейтрофилов в полости носа, проведено гистологическое и иммуногистохимическое исследование полипозной ткани.

В исследование включены 4 группы пациентов: контрольная группа практически здоровых людей, пациенты с диагнозом «ХПРС», пациенты с диагнозом «хронический полипозно-гнойный риносинусит» (ХПГРС) и пациенты с диагнозом «ХПРС» с сопутствующей бронхиальной астмой (ХПРС + БА), в том числе с астматической триадой (ХПРС + непереносимость нестероидных противовоспалительных средств + БА). Дифференцировка групп больных проведена на основе клинической картины и тяжести течения заболевания. Концентрации IL-1 β и IL-8 в носовом секрете определяли методом иммуноферментного анализа (ИФА). Функциональную активность нейтрофилов оценивали с помощью лизосомально-катионного теста на мазках со слизистой оболочки нижней носовой раковины. Гистологический анализ биопсий полипозной ткани выполняли на срезах, окрашенных гематоксилином Карацци и эозином. Локализацию IL-1 β и IL-8 в полипозной ткани исследовали методом непрямой иммуногистохимии.

Адрес для переписки:

Варюшина Елена Анатольевна
ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»
197376, Россия, Санкт-Петербург,
ул. Акад. Павлова, 12.
Тел.: 8 (906) 244-95-19.
Факс: 8 (812) 234-94-89.
E-mail: elenavaryush@gmail.com

Address for correspondence:

Varyushina Elena A.
Institute of Experimental Medicine
197376, Russian Federation, St. Petersburg,
Acad. Pavlov str., 12.
Phone: 7 (906) 244-95-19.
Fax: 7 (812) 234-94-89.
E-mail: elenavaryush@gmail.com

Образец цитирования:

Е.А. Варюшина, Е.В. Безрукова, Е.В. Воробейчиков, Э.В. Кравченко, Ю.В. Сухарева, М.А. Афлитонов, А.С. Симбирцев «Исследование локального воспалительного ответа при разных формах хронического полипозного риносинусита» // Медицинская иммунология, 2022. Т. 24, № 3. С. 539-552. doi: 10.15789/1563-0625-SOL-2479
© Варюшина Е.А. и соавт., 2022

For citation:

E.A. Varyushina, E.V. Bezrukova, E.V. Vorobeychikov, E.V. Kravchenko, Yu.V. Sukhareva, M.A. Aflitonov, A.S. Simbirtsev "Study of local inflammatory response in different clinical forms of chronic polypous rhinosinusitis", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2022, Vol. 24, no. 3, pp. 539-552. doi: 10.15789/1563-0625-SOL-2479
DOI: 10.15789/1563-0625-SOL-2479

Во всех группах пациентов концентрации IL-1 β и IL-8 превышали показатели в контрольной группе. Уровни IL-1 β в группах с ХПГРС, ХПРС + БА повышены по сравнению с группой с ХПРС. В то же время концентрации IL-8 у пациентов в группах с ХПРС и ХПГРС превышают эти показатели в группе с ХПРС + БА. Показатели антимикробной функции нейтрофилов при ХПГРС и ХПРС + БА снижены по сравнению с контрольной группой и ХПРС. При всех формах ХПРС наблюдается комплекс патогистологических изменений, включающий лейкоцитарную инфильтрацию, фиброз, отек и отложения коллагена. Кроме того, при полипозе нарушается целостность эпителиального слоя, происходит его метаплазия, усиливается продукция слизи. Наиболее значительные патоморфологические изменения происходят при ХПРС + БА, в особенности, при астматической триаде. По результатам иммуногистохимического исследования, при различных формах ХПРС IL-1 β - и IL-8-позитивные лейкоциты, преимущественно макрофаги, детектируются в полипозной ткани как субэпителиально, так и в соединительнотканной строме полипа.

Изменения концентраций провоспалительных цитокинов в носовом секрете больных, показателей антимикробной активности нейтрофилов слизистой оболочки и характерные патоморфологические изменения в ткани полипов при ХПРС связаны с тяжестью воспалительного процесса и клинической картиной заболевания. Полученные результаты имеют существенное значение для понимания механизмов патогенеза в различных подгруппах ХПРС, оценки тяжести заболевания и эффективности лечения.

Ключевые слова: хронический полипозный риносинусит, IL-1 β , IL-8, нейтрофилы, лейкоцитарная инфильтрация, респираторный эпителий

STUDY OF LOCAL INFLAMMATORY RESPONSE IN DIFFERENT CLINICAL FORMS OF CHRONIC POLYPOUS RHINOSINUSITIS

Varyushina E.A.^a, Bezrukova E.V.^b, Vorobeychikov E.V.^c,
Kravchenko E.V.^b, Sukhareva Yu.V.^b, Aflitonov M.A.^d, Simbirtsev A.S.^{e, f}

^a Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

^b I. Mechnikov North-Western State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

^c Polypharm LLC, St. Petersburg, Russian Federation

^d I. Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation

^e State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, St. Petersburg, Russian Federation

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

Abstract. Chronic rhinosinusitis (CRS) affects 5–12% of the world's adult population. Chronic rhinosinusitis with nasal polyps (CRSwNP) accounts for 25–30% of all cases of CRS. CRSwNP-associated inflammatory process in nasal mucosa and paranasal sinuses depends on the characteristics of local immunity, including expression of a number of cytokines. The aim of this work was to investigate the parameters of local immunity in various clinical forms of CRSwNP. In this work, the concentrations of pro-inflammatory cytokines, i.e., interleukin-1 β (IL-1 β) and IL-8, antimicrobial function of neutrophils from the nasal cavity was evaluated, along with histological and immunohistochemical studies of polyposis tissue.

The study included 4 groups of patients: a control group of practically healthy individuals, patients with CRSwNP, clinical cases with chronic purulent rhinosinusitis and nasal polyps (CPRSwNP), and patients with CRSwNP complicated by bronchial asthma (CRSwNP + BA), including the cases with asthmatic triad (CRSwNP + intolerance to NSAIDs + BA). The patients were classified on the basis of their clinical characteristics and severity of the course of the disease. Interleukin-1 β (IL-1 β) and IL-8 concentrations in nasal secretions were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). To assess functional activity of neutrophils, a lysosomal cationic test was used on the smears from mucous surface of inferior turbinate. Histological examination of the polypous tissue biopsies was performed in slices stained with Carazzi's hematoxylin and eosin. IL-1 β and IL-8 location in the polypous tissue were detected by indirect immunohistochemistry.

In all groups of the patients, IL-1 β and IL-8 concentrations exceeded those in the control group. The levels of IL-1 β in the groups with CPRSwNP, CRSwNP + BA were significantly increased as compared with the CRSwNP group. IL-8 concentrations in the CRSwNP and CPRSwNP groups were significantly higher than in the CRSwNP + BA group. When analyzing antimicrobial function of neutrophils, the decreased average values

of cytochemical coefficient were shown in CPRSwNP and CRSwNP + BA groups, compared with the control group and CRSwNP. In all clinical forms of CPMS, complex histopathological changes were observed, including leukocyte infiltration, fibrosis, edema, and collagen depositions. In addition, the integrity of epithelial layer was found to be damaged in polyposis, epithelial metaplasia is detected as well as increased mucus production. These disorders lead to a decrease in muco-ciliary clearance in nasal cavity. The most significant pathomorphological changes occur in CRSwNP + BA, especially in cases of asthmatic triad. According to immunohistochemical data, in various forms of CRSwNP, IL-1 β - and IL-8-positive leukocytes, predominantly macrophages, are detected in the polypous tissue both subepithelially and in the connective tissue stroma of the polyps.

Changed concentrations of pro-inflammatory cytokines in nasal secretion of the patients, altered antimicrobial activity of mucosal neutrophils, and characteristic pathomorphological disorders in polypous tissue of patients with CRSwNP are associated with severity of inflammatory process and clinical course of the disease. The results obtained are essential to understanding the mechanisms of pathogenesis in various subgroups of CRSwNP, assessing severity of the disease and efficiency of the treatment applied.

Keywords: chronic polypous rhinosinusitis, IL-1 β , IL-8, neutrophils, leukocyte infiltration, respiratory epithelium

Список сокращений

БА – бронхиальная астма, ВДП – верхние дыхательные пути, ЛКТ-тест – лизосомально-катионный тест, НПВС – нестероидные противовоспалительные средства, СЦК – средний цитохимический коэффициент, ПФ – параформальдегид, ФСБ – фосфатно-солевой буфер, ХРС – хронический риносинусит, ХПРС – хронический полипозный риносинусит, ХПГРС – хронический полипозный гнойный риносинусит, IL-1 – интерлейкин-1, IL-4 – интерлейкин-4, IL-5 – интерлейкин-5, IL-8 – интерлейкин-8, IL-33 – интерлейкин-33, MCP-1 – моноцитарный хемоаттрактантный белок-1, Th2 – Т-хелперы 2-го типа, TSLP – тимический стромальный лимфопоэтин, TNF α – фактор некроза опухоли α .

Введение

Хронический риносинусит (ХРС) – заболевание, от которого страдают 5-12% взрослого населения в мире. ХРС разделяют на две подгруппы – ХРС без полипов и хронический полипозный риносинусит (ХПРС), больные ХПРС составляют 25-30% от всех случаев ХРС. ХПРС – воспалительное заболевание слизистой оболочки носа и околоносовых пазух, характеризующееся затруднением носового дыхания, выделениями из носа слизистого или слизисто-гнойного характера, формированием полипообразных структур слизистой оболочки околоносовых пазух [12]. Развитие ХПРС сопровождается патологическими процессами структурного ремоделирования слизистой оболочки носа и околоносовых пазух [18, 20].

Развитие воспалительного процесса в слизистой оболочке носа и околоносовых пазух определяется особенностями местного иммунитета, в том числе экспрессией ряда цитокинов и их

рецепторов [11, 24, 25, 26, 32]. Решающую роль в развитии воспаления и росте полипов играет Th2-опосредованный иммунный ответ [19, 30]. Пациенты с ХПРС часто также страдают от бронхиальной астмы (БА), которая, как и ХПРС, связана с иммунным ответом 2-го типа, оба заболевания имеют схожие черты воспаления и ремоделирования слизистых оболочек дыхательных путей [17]. Распространенным синдромом при ХПРС также является астматическая триада, представляющая собой сочетание непереносимости нестероидных противовоспалительных средств (НПВС), бронхиальной астмы и назальных полипов [29]. Вместе с тем, патогенез ХПРС является многофакторным и не до конца изучен. Например, цитокины семейства интерлейкина-1 (IL-1) повышают неспецифическую устойчивость к инфекции и к развитию иммунного ответа на чужеродные антигены. По сравнению с другими цитокинами, это семейство цитокинов, особенно IL-1 β , играет ведущую роль в развитии низкодифференцированного вялотекущего воспаления [10]. В ткани носовых полипов повышается экспрессия провоспалительных цитокинов семейства IL-1 (IL-1 α , IL-1 β и IL-18) [24, 25, 26, 32]. Обнаружена связь полиморфизма IL-1 β (-511C, -511T) с развитием ХРС и ХПРС [21], что подтверждает участие IL-1 β в патогенезе данных заболеваний.

ХПРС связан с реакциями Th2-опосредованного иммунного ответа, в которых принимают участие эозинофилы [33]. При этом недавние работы свидетельствуют также о важной роли нейтрофилов при тяжелых формах этого заболевания [8, 9]. Вклад нейтрофилов в патофизиологию и персистенцию воспаления при ХПРС остается в значительной степени неизвестным и требует дальнейших исследований. IL-8 является основным хемоаттрактантом для нейтрофилов при раз-

витии воспалительного ответа в слизистой оболочке верхних дыхательных путей (ВДП) [13, 27]. Изучение продукции цитокинов в носовых секретах пациентов позволяет охарактеризовать функциональное состояние слизистой оболочки ВДП при различных формах течения воспалительного процесса. Гистологическая картина воспалительного процесса в слизистой оболочке, а также цитокиновый профиль могут различаться при различных формах ХПРС [5, 6, 7, 18, 23, 26]. Проведение углубленного морфологического исследования тканей полипов важно для детальной характеристики воспалительной картины, а также оценки функции эпителиального барьера слизистых оболочек полости носа и носовых пазух [1]. Информация, получаемая методами гистологии и иммуногистохимии, в том числе обладает существенной прогностической ценностью [15, 28]. В настоящее время информация о продукции провоспалительных цитокинов, функциональном состоянии нейтрофилов, а также структурных изменениях ткани полипов при различных формах ХПРС остается недостаточной. Это не позволяет определить патогенетические особенности развития различных клинических форм ХПРС и обосновать применение средств иммунотропной терапии. Исходя из вышеизложенного, **цель данной работы** — исследовать параметры местного иммунитета при различных формах ХПРС. В работе были изучены концентрации провоспалительных цитокинов интерлейкина-1 β (IL-1 β) и IL-8, показатели антимикробной функции нейтрофилов в полости носа, проведено гистологическое и иммуногистохимическое исследование полипозной ткани.

Материалы и методы

Пациенты

Обследованы 118 взрослых пациентов с ХПРС с длительностью заболевания от 3 до 15 лет. Возраст пациентов — от 30 до 60 лет. Пациенты старше 60 лет не включались в данное исследование из-за возможных возрастных изменений иммунологических показателей. Пациенты были рандомизированы на группы на основании клинической картины и тяжести течения заболевания. Группа № 1 (контрольная группа) включала 38 практически здоровых людей. В группу № 2 (40 человек) включены пациенты с диагнозом «хронический полипозный риносинусит» (ХПРС), у которых по результатам компьютерной томографии околоносовых пазух (КТ ОНП) диагностировали двусторонний полипозный процесс с полной или частичной обтурацией общих носовых хо-

дов, затемнением клеток решетчатого лабиринта, утолщением слизистой оболочки верхнечелюстных пазух. Пациенты предъявляли жалобы на затруднение носового дыхания и выделения из носа слизистого характера. При пункции верхнечелюстных пазух патологического отделяемого получено не было. У больных группы № 3 (38 человек) с диагнозом «хронический полипозно-гнойный риносинусит» (ХПГРС), кроме двустороннего полипозного процесса на КТ ОНП отмечали затемнение верхнечелюстных пазух за счет наличия жидкости и более выраженного утолщения слизистой оболочки. Пациенты предъявляли жалобы на затруднение носового дыхания и слизисто-гнойные выделения из носа. При пункции также определяли гнойное отделяемое. У больных группы № 4 (40 человек) диагностировали двусторонний полипозный риносинусит, протекающий на фоне БА, в том числе с астматической триадой (ХПРС + непереносимость НПВС + БА). На КТ ОНП у больных выявляли затемнение клеток решетчатого лабиринта и верхнечелюстных пазух за счет неравномерного утолщения слизистой оболочки. При пункции верхнечелюстных пазух отделяемого не выявляли. В этой группе больные предъявляли жалобы не только на затруднение носового дыхания, но и на тягучие слизистые выделения из носа. БА находилась в стадии ремиссии, ее симптомы контролировали базисной терапией. У пациентов из перечисленных четырех групп был собран носовой секрет для определения в нем концентраций IL-1 β и IL-8. В данных группах были получены соскобы со слизистой оболочки носовых пазух для оценки функций нейтрофилов. У больных из групп 2, 3 и 4 были также получены биопсии полипозной ткани для исследований методами гистологии и иммуногистохимии.

Определение концентраций IL-1 β и IL-8 в носовом секрете пациентов

Определение концентраций интерлейкинов IL-1 β и IL-8 в носовом секрете проводили методом твердофазного иммуноферментного анализа с применением тест-систем производства ООО «Цитокин» (Россия), согласно прилагаемой к набору инструкции. Результаты реакции регистрировали на спектрофотометре для планшетов модели 3550 (Bio-Rad, США) при длине волны 450 нм. Концентрацию цитокинов в образцах определяли по калибровочной кривой соотношения оптической плотности раствора в лунке и известной концентрации данного цитокина (стандарт), умножая на соответствующее разведение образца.

Оценка функциональной активности нейтрофилов в слизистой оболочке

Материал для исследования получали методом соскоба цитологической щеточкой со слизистой оболочки нижней носовой раковины. Для оценки функциональной активности нейтрофильных гранулоцитов использовали лизосомально-катионный тест (ЛКТ-тест) [2]. Материал со слизистой оболочки носа наносили на предметное стекло, мазки окрашивали спиртовым раствором прочного зеленого и азуром II. Средний цитохимический коэффициент (СЦК) нейтрофилов определяли полуколичественным способом по формуле: $СЦК = (3a + 2b + 1c + 0d)/n$, где: а – гранулы занимают всю цитоплазму клетки, б – гранулы занимают 3/4 части цитоплазмы, в – единичные гранулы, г – отсутствие гранул, n – количество подсчитанных клеток в препарате.

Гистологическое и иммуногистохимическое исследование

Для гистологического и иммуногистохимического исследований у пациентов был получен операционный материал (образцы полипозной ткани). Материал при необходимости разрезали на кусочки размером максимально $5 \times 5 \times 5$ мм и фиксировали в 4%-ном растворе параформальдегида (ПФ) (Sigma, США) в фосфатно-солевом буфере (ФСБ), pH 7,2-7,4, в течение 40 мин при +4 °C. Далее образцы отмывали в ФСБ, пропитывали в 20%-ном растворе сахарозы в ФСБ, помещали в среду для замораживания тканей ОСТ (Sakura, Япония) и замораживали в жидком азоте. Криостатные срезы толщиной 6 мкм были получены на криостате CM 1510-1 (Leica, Германия), срезы монтировали на предметные стекла Super Frost Plus (Mentzel, Германия).

Для гистологического исследования срезы на предметных стеклах окрашивали по стандартной методике гематоксилином Карацци и эозином («Биовитрум», Россия), обезживали в спиртах возрастающей концентрации, просветляли в ксилоле и заключали под покровные стекла.

Локализацию IL-1 β и IL-8 на срезах биопсийного материала исследовали методом непрямой иммуногистохимии. В качестве первых антител использовали мышинные моноклональные антитела к человеческим IL-1 β и IL-8 (любезно предоставлены Синевой С.А. и Котовым А.Ю., ФГУП «Гос. НИИ ОЧБ», Россия). Срезы обводили карандашом для иммуногистохимии (Elite PAP Pen, Diagnostic BioSystems). Первичные антитела разводили в Antibody Diluent with Background Reducing Components Code S3022B (Dako), рабочие разведения антител были подобраны в пред-

варительных экспериментах. В случае отрицательного контроля, на срезы наносили дилуэнт без первичных антител. После инкубации с антителами проводили отмывку в отмывочном буфере 50 mM TBS IHC Wash Buffer + Tween® (Cell Marque) 2 раза по 10 мин. В качестве вторичных антител при выявлении IL-1 β использовали систему детекции N-Histofine Simple Stain MAX PO (MULTI) Universal Immuno-peroxidase Polymer, а в качестве окрашивающего реагента – DAB Kit (Cell Marque) в соответствии с инструкциями производителей. При выявлении IL-8 в качестве вторых антител использовали биотинилированные кроличьи анти-мышинные антитела (Sigma, США). Далее использовали конъюгат стрептавидин-щелочная фосфатаза (Sigma, США). Выявление щелочной фосфатазы проводили с помощью реагента Naphtol-AS-MX phosphat и красителя Fast Red (Sigma, США) в соответствии с инструкциями производителя.

Срезы докрашивали гематоксилином Карацци («Биовитрум») и заключали в среду Clear Mount (GeneTex). Препараты изучали в оптическом микроскопе DMLB со встроенной камерой DC300 (Leica Microsystems AG) на нескольких увеличениях ($\times 160$, $\times 320$, $\times 640$, $\times 1600$).

Статистическая обработка результатов

При статистической обработке результатов исследования использовали методы описательной и параметрической статистики. Для определения достоверности различий значений цитокинов и среднего цитохимического коэффициента применяли дисперсионный анализ и Т-критерий Стьюдента для независимых выборок. Вероятность $p < 0,05$ оценивали как достаточную для вывода о наличии статистически достоверных различий данных.

Результаты

Концентрации провоспалительных цитокинов в носовом секрете пациентов

В носовом секрете у здоровых добровольцев IL-1 β содержится в низких концентрациях. Уровни IL-1 β в группах с ХПГРС, а также с ХПРС + БА достоверно превышают концентрации IL-1 β группе с ХПРС. Не выявлено статистически значимых различий в концентрациях IL-1 β между группами с ХПГРС и ХПРС + БА (рис. 1А). Обнаруженные в контрольной группе концентрации IL-8 являются более высокими, чем в случае IL-1 β (рис. 1Б). Уровни IL-8 у пациентов в группе с ХПРС в среднем в 3,27 раза превышают показатели в контроле, в группе с ХПГРС – в 3,03 раза,

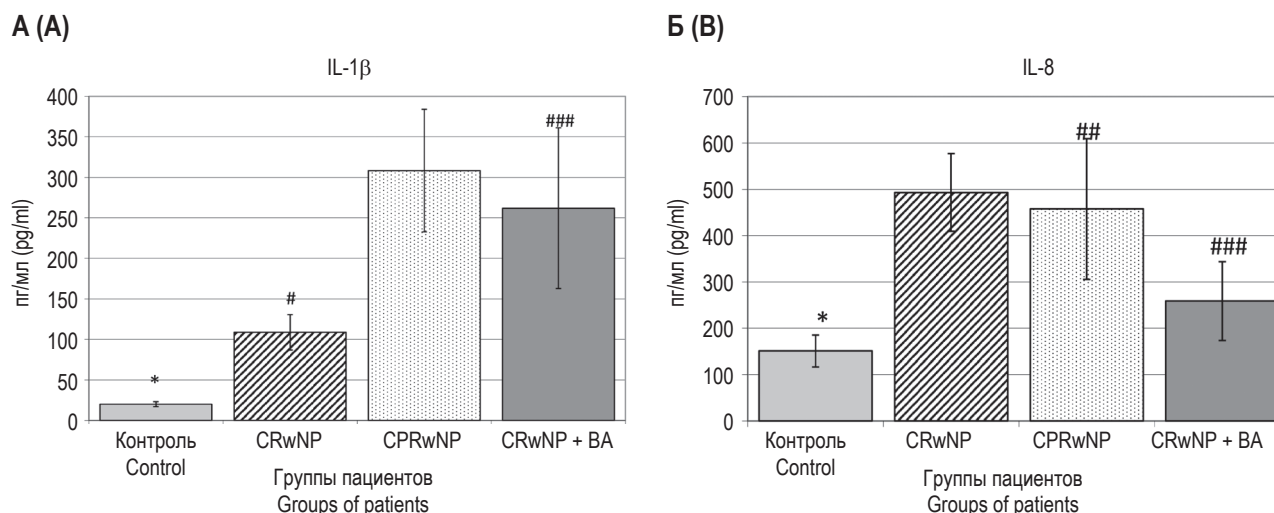


Рисунок 1. Концентрации провоспалительных цитокинов IL-1β и IL-8 (ось ординат) в носовом секрете пациентов (M±SD)

Примечание. ХПРС – хронический полипозный риносинусит, ХПГРС – хронический полипозный гнойный риносинусит, ХПРС + БА – хронический полипозный риносинусит + бронхиальная астма, контроль – практически здоровые лица. * – различия между контрольной и группами ХПРС, ХПГРС и ХПРС + БА достоверны, $p < 0,001$; # – различия между группами ХПРС и ХПГРС достоверны, $p < 0,001$; ## – различия между группами ХПГРС и ХПРС + БА достоверны, $p < 0,001$; ### – различия между группами ХПРС и ХПРС + БА достоверны, $p < 0,001$.

Figure 1. Concentrations of the pro-inflammatory cytokines IL-1β and IL-8 (ordinate axis) in the nasal secretions of patients (M±SD)
Note. CRSwNP, chronic rhinosinusitis with nasal polyps; CPRSwNP, chronic purulent rhinosinusitis with polyps; CRSwNP + BA, chronic polyposis rhinosinusitis + bronchial asthma; control, healthy individuals. *, differences between control group and groups CRSwNP; CPRSwNP and CRSwNP + BA are significant, $p < 0.001$; #, differences between groups CRSwNP and CPRSwNP are significant, $p < 0.001$; ##, differences between groups CPRSwNP and CRSwNP + BA are significant, $p < 0.001$; ###, differences between groups CRSwNP and CRSwNP + BA are significant, $p < 0.001$.

это повышение является статистически достоверным. В группе с ХПРС + БА выявлено увеличение концентраций IL-8 в среднем в 1,71 раза, которое, однако, не достигает статистически значимых величин (рис. 1Б).

Функциональная активность нейтрофилов слизистой оболочки при различных формах ХПРС

Согласно результатам, представленным в таблице 1, значения СЦК нейтрофилов в группах больных ХПГРС и ХПРС + БА значительно снижены по сравнению с контрольной группой, а также группой с ХПРС ($p < 0,001$). В группе больных с ХПРС не обнаружено достоверных изменений значений СЦК нейтрофилов по сравнению с контрольной группой ($p > 0,05$).

Гистологическое исследование биоптатов полипов при различных формах ХПРС

При легкой форме ХПРС на светооптическом уровне на срезах хорошо виден респираторный эпителий, покрывающий полип (рис. 2А, см. 3-ю стр. обложки). На некоторых участках наблюдается отрыв эпителия от базальной мембраны, а в зонах, расположенных в центральной части полипа, эпителий отсутствует (рис. 2Б, см. 3-ю стр.

обложки). Бокаловидные клетки сильно гипертрофированы, визуализируются вакуоли, заполненные слизью, на апикальной части эпителиальных клеток хорошо видны реснички (рис. 2В, см. 3-ю стр. обложки). В строме присутствует лейкоцитарная инфильтрация – плазматические клетки, лимфоциты, выраженные скопления эозинофилов, единичные нейтрофилы (рис. 2А, Б, см. 3-ю стр. обложки). При резистентной форме ХПРС (устойчивой к лечению глюкокортикоидами) на срезах полипа визуализируется респираторный эпителий, при этом наблюдается меньшее количество клеток с ресничками, чем при легкой форме (рис. 2Г, см. 3-ю стр. обложки). Наблюдаются участки дистрофических изменений (отрыв апикальной части и разрушение эпителиальных клеток), а также слизь на поверхности эпителия. На некоторых участках присутствуют гипертрофированные бокаловидные клетки, содержащие вакуоли, однако их меньше, чем при легкой форме. В строме наблюдается отек и лейкоцитарная инфильтрация (рис. 2Г, см. 3-ю стр. обложки). При ХПГРС на препаратах визуализируется массивная лейкоцитарная инфильтра-

ТАБЛИЦА 1. СРЕДНИЙ ЦИТОХИМИЧЕСКИЙ КОЭФФИЦИЕНТ НЕЙТРОФИЛОВ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ НОСА У ПАЦИЕНТОВ С РАЗЛИЧНЫМИ ФОРМАМИ ХПРС

TABLE 1. AVERAGE CYTOCHEMICAL COEFFICIENT OF THE NEUTROPHILS IN NASAL MUCOSA IN PATIENTS WITH VARIOUS FORMS CRSwNP

Группы больных Groups of patients	M	D	F	Критическое значение F Critical value F	Уровень значимости p Significance level p
ХПРС CRSwNP	1,66	0,008	302,12	4,08	< 0,001
ХПГРС CPRSwNP	1,16	0,008			
ХПРС CRSwNP	1,66	0,008	7,73	4,08	< 0,05
ХПРС + БА CRSwNP + BA	1,56	0,018			
ХПГРС CPRSwNP	1,16	0,008	121,28	4,08	< 0,001
ХПРС + БА CRSwNP + BA	1,56	0,018			
ХПРС CRSwNP	1,66	0,008	0,04	4,08	> 0,05
Контроль Control	2,65	0,005			
ХПГРС CPRSwNP	1,16	0,008	385,78	4,08	< 0,001
Контроль Control	2,65	0,005			
ХПРС + БА CRSwNP + BA	1,56	0,018	8,21	4,08	< 0,05
Контроль Control	2,65	0,005			

Примечание. М – среднее значение СЦК (средний цитохимический коэффициент), D – дисперсия, F – значение F критерия Фишера, p – уровень значимости. Группы больных: ХПРС – хронический полипозный риносинусит, ХПГРС – хронический полипозный гнойный риносинусит, ХПРС + БА – хронический полипозный риносинусит + бронхиальная астма, контроль – практически здоровые лица.

Note. M, the medium value of the average cytochemical coefficient (ACC); D, dispersion; F, value of Fisher criterion; p, significance level. Groups of patients: CRSwNP, chronic rhinosinusitis with nasal polyps; CPRSwNP, chronic purulent rhinosinusitis with polyps; CRSwNP + BA, chronic polyposis rhinosinusitis + bronchial asthma; control, healthy individuals.

ция, в состав которой входит большое количество нейтрофилов. В соединительнотканной строме полипа обнаруживаются полости, заполненные гнойным содержимым (рис. 2Д, Е, см. 3-ю стр. обложки).

При гистологическом исследовании срезов полипов при ХПРС + БА наблюдаются значительные изменения эпителия. Респираторный

эпителий сохранен на некоторых участках, однако в других визуализируются зоны отрыва эпителиальных клеток от базальной мембраны. Наблюдаются зоны с ранними признаками метаплазии респираторного эпителия в многослойный плоский эпителий. Субэпителиально отмечается лейкоцитарная инфильтрация (рис. 3А, см. 3-ю стр. обложки). На некоторых

ТАБЛИЦА 2. ДОСТОВЕРНОСТЬ РАЗЛИЧИЙ В ОТНОСИТЕЛЬНОМ КОЛИЧЕСТВЕ ЛЕЙКОЦИТОВ В ИНФИЛЬТРАТАХ ПОЛИПОЗНОЙ ТКАНИ ПРИ РАЗНЫХ ФОРМАХ ХПРС

TABLE 2. SIGNIFICANCE OF DIFFERENCES IN THE PERCENTAGE OF LEUKOCYTES IN INFILTRATES OF POLYPOUS TISSUE IN VARIOUS FORMS OF CRSwNP

Группы больных Groups of patients	Тип клеток Cells	M	SD	T	Критическое значение T Critical value T	Уровень значимости p Significance level p
ХПРС + БА CRSwNP + BA	lym	75,00	15,05	-0,32	2,07	> 0,05
ХПРС CRSwNP	lym	76,53	9,63			
ХПРС + БА CRSwNP + BA	eos	16,00	10,23	3,84	2,11	< 0,01
ХПРС CRSwNP	eos	5,40	2,99			
ХПРС CRSwNP	neu	1,05	1,36	-9,8	2,36	< 0,01
ХПГРС CPRSwNP	neu	10,28	2,36			
ХПРС + БА CRSwNP + BA	pla	7,80	7,35	-3,10	2,05	< 0,01
ХПРС CRSwNP	pla	17,20	9,14			

Примечание. lym – лимфоциты, eos – эозинофилы, neu – нейтрофилы, pla – плазмоциты. M – среднее значение, % от общего количества, SD – стандартное отклонение, T – значение T-критерия Стьюдента, p – уровень значимости. Группы больных: ХПРС – хронический полипозный риносинусит, ХПГРС – хронический полипозный гнойный риносинусит, ХПРС + БА – хронический полипозный риносинусит + бронхиальная астма, контроль – практически здоровые лица.

Note. lym, lymphocytes; eos, eosinophils; neu, neutrophils; pla, plasma cells. M, mean value; % of total SD, standard deviation; T, value of Student's test; p, significance level. Groups of patients: CRSwNP – chronic rhinosinusitis with nasal polyps; CPRSwNP, chronic purulent rhinosinusitis with polyps; CRSwNP + BA, chronic polyposis rhinosinusitis + bronchial asthma; control, healthy individuals.

участках поверхности полипа эпителий отсутствует, и наблюдаются значительные очаги фиброизирования с массивными отложениями коллагена (рис. 3Б, см. 3-ю стр. обложки). В строме полипа обращает на себя внимание большое количество гипертрофированных слизистых желез (рис. 3А, Б, см. 3-ю стр. обложки). Между ними располагаются сосуды, а также лейкоцитарная инфильтрация (рис. 3В, см. 3-ю стр. обложки).

ХПРС отягощенный астматической триадой характеризуется значительными изменениями эпителиальной оболочки полипов. Следует отметить, что на изученных участках препаратов респираторный эпителий местами образует складки и не имеет ресничек (рис. 3Г, см. 3-ю стр. обложки). Наблюдаются признаки поздней метаплазии респираторного эпителия в многослойный плоский эпителий (рис. 3Д, см. 3-ю стр. обложки). Субэпителиально и в соединительно-тканной

строме полипа отчетливо визуализируется выраженная инфильтрация плазматическими клетками, эозинофилами, очаговые лимфоцитарные инфильтраты (рис. 3Д, Е, см. 3-ю стр. обложки).

Результаты подсчета относительного количества различных типов лейкоцитов демонстрируют, что в составе полипозной ткани наблюдается главным образом смешанный вид инфильтраций. При всех изученных формах ХПРС преобладают лимфоциты. Относительное количество лимфоцитов не различается между различными группами пациентов (табл. 2). В группах ХПРС и ХПРС + БА в составах инфильтратов наблюдаются нейтрофилы в небольшом количестве. Относительное количество нейтрофилов является максимальным в группе больных с ХПГРС. При ХПРС + БА количество эозинофилов в ткани полипа больше, чем при других формах ХПРС. Относительное количество плазматических клеток на срезах в груп-

пе с ХПРС статистически достоверно превышает такое значение в группе с ХПРС + БА.

Иммуногистохимическое исследование

При различных формах ХПРС в соединительной ткани полипов присутствуют лейкоциты, в цитоплазме которых иммуногистохимически определяются провоспалительные цитокины IL-1 β и IL-8 (рис. 4, см. 3-ю стр. обложки). Большинство IL-1 β - и IL-8-позитивных лейкоцитов имеют крупный размер (до 20 мкм), ядро овальной или бобовидной формы, низкое ядерно-цитоплазматическое соотношение, что является морфологическими признаками макрофагов (рис. 4В, Г, см. 3-ю стр. обложки). При этом часть IL-8-позитивных лейкоцитов обладают сегментированным ядром и морфологически сходны с нейтрофилами. IL-1 β - и IL-8-позитивные лейкоциты выявлены как в субэпителиальной области, так и в соединительнотканной стропе полипов. В отрицательном контроле специфической реакции не было выявлено (данные не представлены).

Обсуждение

В данной работе проведено комплексное исследование локального воспалительного ответа при различных формах ХПРС, которое включало оценку продукции провоспалительных цитокинов, функциональной активности нейтрофилов в носовой полости, гистологическое и иммуногистохимическое исследования полипозной ткани. Измерения содержания цитокинов IL-1 β и IL-8 в носовых секретах показали, что у здоровых добровольцев IL-1 β присутствует в незначительных концентрациях, в то время как уровни IL-8 были более высокими и достигали в среднем $150,96 \pm 34,53$ пг/мл. Наряду с другими медиаторами врожденного иммунитета: иммуноглобулинами, биоактивными пептидами, лизоцимом, лактоферрином и др., IL-8 принимает участие в формировании местных защитных реакций и поддержании гомеостаза в слизистой оболочке полости носа. Сравнительный анализ концентраций провоспалительных цитокинов в носовом секрете пациентов позволил выявить различия между изученными группами с ХПРС. Уровни IL-1 β резко повышались в группах с ХПГРС и ХПРС + БА, в группе с ХПРС это повышение было более умеренным. Это свидетельствует о том, что продукция IL-1 β коррелирует с тяжестью воспалительного процесса. Наиболее значительное возрастание концентраций IL-8 (в три и более раз) отмечено в группах с ХПРС и ХГПРС. При этом у больных ХПРС с сопутству-

ющей бронхиальной астмой уровни IL-8 были не столь высокими, как в двух других группах. Данные указывают на то, что увеличение продукции IL-8 тесно связано с развитием воспалительного и гнойно-воспалительного процессов, и что механизмы протекания воспаления различны по сравнению с группой пациентов с сопутствующей БА. Полученные результаты согласуются с опубликованными данными других исследователей, которые выявили положительные корреляции между тяжестью заболевания ХПРС и уровнями IL-1 β и IL-8 в носовых секретах больных, но не обнаружили таких корреляций у пациентов с полипозом и БА [25].

Иммуногистохимический анализ показал, что при всех клинических формах ХПРС в составе полипозных инфильтратов наблюдаются лейкоциты, в цитоплазме которых определялись провоспалительные цитокины IL-1 β и IL-8. Морфологически большинство IL-1 β - и IL-8-позитивных лейкоцитов имели признаки макрофагов. Часть IL-8-позитивных лейкоцитов обладают сегментированным ядром и морфологическим сходством с нейтрофилами. Таким образом, лейкоциты, инфильтрирующие полипозную ткань при ХПРС, являются активными продуцентами IL-1 β и IL-8 в очаге воспаления.

Роль цитокинов в формировании назальных полипов при ХРС активно исследовалась в последние годы [11, 24, 25, 26, 32]. Установлено, что ХПРС характеризуется цитокиновым профилем, соответствующим Th2-опосредованному иммунному ответу, сопровождающегося повышенной экспрессией интерлейкина-4 (IL-4), интерлейкина-5 (IL-5), интерлейкина-33 (IL-33), тимического стромального лимфопоэтина (TSLP), а также их рецепторов [19, 24, 30]. При этом в ткани носовых полипов формируется повышенный воспалительный фон, за счет экспрессии провоспалительных цитокинов семейства IL-1 (IL-1 α , IL-1 β , IL-8), а также фактора некроза опухоли (TNF α) [24, 25, 26, 32]. Полученные нами результаты, отражающие взаимосвязь между тяжестью патологического процесса при ХПРС и изменениями концентрации провоспалительных цитокинов IL-1 β и IL-8 также подтверждают преобладание воспалительного цитокинового профиля в полипозной ткани. По нашему мнению, это отражает степень воспаления и нарушений мукозального иммунитета в слизистой оболочке носа и околоносовых пазух.

Согласно полученным результатам, антимикробная активность нейтрофилов была ниже нормальных значений во всех исследованных

группах пациентов. Несмотря на большое количество нейтрофилов в очаге воспаления, их функциональная активность снижена, что в конечном итоге может приводить к недостаточному очищению ВДП от инфекции. Ранее было показано, что привлечение в очаг воспаления нейтрофильных гранулоцитов играет важную роль при острых респираторных инфекциях, при этом количество нейтрофилов и концентрации IL-8 в носовой полости коррелируют с тяжестью клинических симптомов [13]. В последние годы происходит переосмысление значения нейтрофилов при полипозе, есть данные о том, что эти лейкоциты, наряду с эозинофилами, играют важную роль при тяжелых формах ХПРС [8, 9]. Хотя в крови пациентов с ХПРС преобладают зрелые нейтрофилы, в ткани полипов наблюдается значительное изменение в активации нейтрофилов, когда они попадают непосредственно в воспалительное микроокружение [3, 9]. Активированные нейтрофилы вносят вклад в антибактериальную защиту за счет фагоцитоза золотистого стафилококка и окислительного взрыва. Также эти клетки принимают участие в развитии гиперреактивности дыхательных путей [4].

Воспалительный статус в полипозных тканях больных с различными формами ХПРС был подтвержден нами гистологическими и иммуногистохимическими исследованиями. Анализ патоморфологической картины полипов позволил нам выявить специфические морфологические особенности ХПРС в зависимости от тяжести заболевания. У всех больных, независимо от клинической формы ХПРС, была выявлена лейкоцитарная инфильтрация полипозной ткани, располагающаяся как субэпителиально, так и в строме полипов. Морфологическая картина в образцах полипозной ткани была крайне разнообразна. В большом количестве присутствовали эозинофилы, нейтрофилы, тучные клетки, мононуклеарные клетки (лимфоциты и макрофаги), плазматические клетки. Встречались также смешанные инфильтраты, состоящие из разных типов лейкоцитов. Наиболее выраженная инфильтрация полипозной ткани наблюдалась при ХПРС + БА с астматической триадой, где подсчеты выявили высокий процент эозинофилов. Также показано, что в группе с ХПРС резко возросло количество нейтрофилов, что подтверждает различный характер протекания воспалительного процесса при этих двух формах ХПРС.

Известно, что лейкоцитарная инфильтрация слизистой оболочки носа и полипов связана с градиентом концентраций цитокинов, который

формируется в результате повреждения или инфекции [20]. Рекрутирование эозинофилов в слизистую оболочку носа из кровотока требует сложного взаимодействия между назальным эпителием, врожденными лимфоидными клетками 2-го типа, активируемыми эпителиальными клетками, и адаптивными иммунными клетками, секретирующими алармины, цитокины и специфические хемокины [31]. Присутствие в составе лейкоцитарной инфильтрации нейтрофилов обусловлено, большей частью, хемокином IL-8 [13, 27]. Известно, что продукция IL-8 стимулируется присутствием IL-1, что подтверждает существенную роль IL-1 в патогенезе ХПРС. Эозинофильную и нейтрофильную инфильтрацию полипозной ткани нельзя рассматривать как отдельные процессы. Известно, что активированные нейтрофилы могут усиливать трансмиграцию эозинофилов и что IL-8-опосредованное рекрутирование нейтрофилов вызывает накопление эозинофилов [4, 16]. Таким образом, эозинофилы и нейтрофилы могут стимулировать приток обоих типов клеток в слизистую оболочку ВДП, что приводит к смешанному воспалению и к более стойким и тяжелым формам протекания ХПРС.

Важную роль в развитии ХПРС играют процессы, связанные с нарушением барьерной функции респираторного эпителия. При более легких формах ХПРС выявляется гипертрофия бокаловидных клеток, что служит причиной избыточной продукции слизи. Эти изменения приводят к снижению функции мукоцилиарного клиренса и в конечном итоге к персистенции инфекции. Эти данные подтверждаются опубликованными результатами исследований активности ресничек эпителия ВДП [1]. Вместе с тем, при ХПРС + БА и в особенности при формировании астматической триады наблюдаются существенные дистрофические изменения эпителия. Наблюдаемая нами и другими авторами плоскоклеточная метаплазия и секреторная гиперплазия эпителия полипов свидетельствуют о дефектах регуляции пролиферации эпителиальных клеток. По данным литературы, в эпителии полипов носовой полости наблюдается увеличение количества слабо пролиферирующих базальных клеток, по индексу $p63^{+}/Ki67^{+}$. Это приводит к формированию дисфункционального эпителия с нарушенными барьерными свойствами [33].

При всех клинических формах полипоза субэпителиально визуализируются отложения коллагена, что свидетельствует о процессах фиброобразования, постепенно происходящих в этих тканях. В строме полипов также определяется большое количество фибрина, являющегося фактором,

поддерживающим постоянную отечность слизистой оболочки при ХПРС, из-за способности привлекать белки из кровотока в ткани полипов [30]. Присутствие большого количества фибробластов в соединительной ткани назальных полипов обеспечивает постоянный приток макрофагальных клеток и нейтрофилов, за счет повышенной секреции моноцитарного хемоаттрактантного белка-1 (MCP-1) и IL-8, поддерживая, таким образом, постоянный воспалительный фон [14, 22].

Заключение

В результате проведенных исследований показано, что тяжесть патологического процесса при ХПРС определяется воспалительным статусом в назальных полипах, что подтверждается с одной стороны инфильтрацией полипозной ткани лейкоцитами, имеющими положительную реакцию на IL-1β и IL-8, а с другой – высокими концентрациями провоспалительных цитокинов IL-1β и IL-8 в назальных секретах. При осложненных формах

ХПРС происходит нарушение антимикробной функции нейтрофилов в слизистой оболочке, что в конечном итоге может приводить к недостаточному очищению ВДП от инфекции. Воспалительный статус в полипозных тканях больных с различными формами ХПРС был подтвержден гистологическими исследованиями. Анализ патоморфологической картины полипов выявил специфические морфологические особенности ХПРС в зависимости от тяжести заболевания.

Таким образом, изменения концентраций провоспалительных цитокинов в носовом секрете больных, показателей антимикробной активности нейтрофилов слизистой оболочки и характерные патоморфологические изменения в ткани полипов при ХПРС связаны с выраженностью воспалительного процесса и клинической картиной заболевания. Полученные результаты имеют существенное значение для понимания механизмов патогенеза в различных подгруппах ХПРС, оценки тяжести заболевания и эффективности лечения.

Список литературы / References

1. Захарова Г.П., Ильинская Е.В., Шабалин В.В. Особенности двигательной активности и ультраструктурной организации реснитчатого эпителия у больных хроническим полипозным и полипозно-гнойным риносинуситом // Российская оториноларингология, 2005. № 6. С. 3-7. [Peculiarities of motor activity and ultrastructural organization of the ciliated epithelium in patients with chronic polypous and polypous-purulent rhinosinusitis. *Rossiyskaya otorinolaringologiya = Russian Otorhinolaryngology*, 2005, no. 6, pp. 3-7. (In Russ.)]
2. Пигаревский В.Е. Зернистые лейкоциты и их свойства. М., 1978. 128 с. [Pigarevsky V.E. Granular leukocytes and their properties]. Moscow, 1978. 128 p.
3. Arebro J., Drakskog C., Winqvist O., Bachert C., Kumlien Georén S., Cardell L.-O. Subsetting reveals CD16^{high} CD62L^{dim} neutrophils in chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *Allergy*, 2019, Vol. 74, no. 12, pp. 2499-2501.
4. Arebro J., Ekstedt S., Hjalmarsson E., Winqvist O., Georén S.K., Cardell L.-O. A possible role for neutrophils in allergic rhinitis revealed after cellular subclassification. *Sci. Rep.*, 2017, Vol. 7, 43568. doi: 10.1038/srep43568.
5. Bachert C., Zhang N., Hellings P.W., Bousquet J. Endotype-driven care pathways in patients with chronic rhinosinusitis. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2018, Vol. 141, no. 5, pp. 1543-1551.
6. Berger G., Kattan A., Bernheim J., Ophir D. Polypoid mucosa with eosinophilia and glandular hyperplasia in chronic sinusitis: a histopathological and immunohistochemical study. *Laryngoscope*, 2002, Vol. 112, no. 4, pp. 738-745.
7. Brescia G., Alessandrini L., Giacomelli L., Parrino D., Zanotti C., Tealdo G., Franz L., Carraro C., Barion U., Marioni G. A classification of chronic rhinosinusitis with nasal polyps based on structured histopathology. *Histopathology*, 2020, Vol. 76, no. 2, pp. 296-307.
8. Delemarre T., Bochner B.S., Simon H.-U., Bachert C. Rethinking neutrophils and eosinophils in chronic rhinosinusitis. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2021, Vol. 148, no. 2, pp. 327-335.
9. Delemarre T., Holtappels G., de Ruyck N., Zhang N., Nauwynck H., Bachert C., Gevaert E. A substantial neutrophilic inflammation as regular part of severe type 2 chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2021, Vol. 147, no. 1, pp. 179-188.e2.
10. Dinarello C.A. Overview of the IL-1 family in innate inflammation and acquired immunity. *Immunol. Rev.*, 2018, Vol. 281, no. 1, pp. 8-27.
11. Figueiredo C.R., Santos R.P., Silva I.D., Weckx L.L.M. Microarray cDNA to identify inflammatory genes in nasal polyposis. *Am. J. Rhinol.*, 2007, Vol. 21, no. 2, pp. 231-235.

12. Fokkens W., Desrosiers M., Harvey R., Hopkins C., Mullol J., Philpott C., Alobid I., Anselmo-Lima W.T., Bachert C., Baroody F., Bernal-Sprekelsen M., von Buchwald C., Cervin A., Cohen N., Constantinidis J., de Gaborry L., Douglas R., Gevaert P., Hafner A., Hellings P., Joos G., Kalogjera L., Kern R., Knill A., Kocks J., Landis B.N., Limpens J., Lebeer S., Lourenco O., Matricardi P.M., Meco C., Mahony L.O., Reitsma S., Ryan D., Schlosser R., Senior B., Smith T., Teeling T., Tomazic P.V., Toppila-Salmi S., Wang D.Y., Wang D., Zhang L., Lund V. EPOS2020: development strategy and goals for the latest European Position Paper on Rhinosinusitis. *Rhinology*, 2019, Vol. 57, no. 3, pp. 162-168.
13. Henriquez K.M., Hayney M.S., Xie Y., Zhang Z., Barrett B. Association of interleukin-8 and neutrophils with nasal symptom severity during acute respiratory infection. *J. Med. Virol.*, 2015, Vol. 87, no. 2, pp. 330-337.
14. Homma H., Kamiya K., Kusunoki T., Ikeda K. Multiplex analyses of cytokine and chemokine release from the cultured fibroblast of nasal polyps: the effect of IL-17A. *Acta Otolaryngol.*, 2013, Vol. 133, no. 10, pp. 1065-1072.
15. Jiang N., Kern R.C., Altman K.W. Histopathological evaluation of chronic rhinosinusitis: a critical review. *Am. J. Rhinol. Allergy*, 2013, Vol. 27, pp. 396-402.
16. Kikuchi I., Kikuchi S., Kobayashi T., Hagiwara K., Sakamoto Y., Kanazawa M., Nagata M. Eosinophil trans-basement membrane migration induced by Interleukin-8 and neutrophils. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 2006, Vol. 34, no. 6, pp. 760-765.
17. Laidlaw T.M., Mullol J., Woessner K.M., Amin N., Mannent L.P. Chronic rhinosinusitis with nasal polyps and asthma. *J. Allergy Clin. Immunol. Pract.*, 2021, Vol. 9, no. 3, pp. 1133-1141.
18. Lee K., Tai J., Lee S.H., Kim T.H. Advances in the knowledge of the underlying airway remodeling mechanisms in chronic rhinosinusitis based on the endotypes: a review. *Int. J. Mol. Sci.*, 2021, Vol. 22, no. 2, 910. doi: 10.3390/ijms22020910.
19. Liao B., Cao P.-P., Zeng M., Zhen Z., Wang H., Zhang Y.-N., Hu C.-Y., Ma J., Li Z.-Y., Song J., Liu J.-X., Peng L.-Y., Liu Y., Ning Q., Liu Z. Interaction of thymic stromal lymphopoietin, IL-33, and their receptors in epithelial cells in eosinophilic chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *Allergy*, 2015, Vol. 70, no. 9, pp. 1169-1180.
20. Meng J., Zhou P., Liu Y., Liu F., Yi X., Liu S., Holtappels G., Bachert C., Zhang N. The development of nasal polyp disease involves early nasal mucosal inflammation and remodelling. *PLoS One*, 2013, Vol. 8, no. 12, e82373. doi: 10.1371/journal.pone.0082373.
21. Mohamad S., Ab Hamid S.S., Azlina A., Md Shukri N. Association of IL-1 gene polymorphisms with chronic rhinosinusitis with and without nasal polyp. *Asia Pac. Allergy*, 2019, Vol. 9, no. 3, e22. doi: 10.5415/apallergy.2019.9.e22.
22. Niu Y.-Z., Gong G.-Q., Chen S., Chen J.-J., Kong W.-J., Wang Y.-J. Effects of IL-17 on expression of GRO- α and IL-8 in fibroblasts from nasal polyps. *J. Huazhong Univ. Sci. Technolog. Med. Sci.*, 2014, Vol. 34, no. 4, pp. 591-595.
23. Okada N., Nakayama T., Asaka D., Inoue N., Tsurumoto T., Takaishi S., Yoshikawa M. Distinct gene expression profiles and regulation networks of nasal polyps in eosinophilic and non-eosinophilic chronic rhinosinusitis. *Int. Forum Allergy Rhinol.*, 2018, Vol. 8, no. 5, pp. 592-604.
24. Otto B.A., Wenzel S.E. The role of cytokines in chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *Curr. Opin. Otolaryngol. Head Neck Surg.*, 2008, Vol. 16, no. 3, pp. 270-274.
25. Perić A., Vojvodić D., Perić A.V., Radulović V., Miljanović O. Correlation between cytokine levels in nasal fluid and scored clinical parameters in patients with nasal polyposis. *Indian J. Otolaryngol. Head Neck Surg.*, 2012, Vol. 65, Suppl. 2, pp. 295-300.
26. Plewka D., Grzanka A., Drzewiecka E., Plewka A., Misiólek M., Lisowska G., Rostkowska-Nadolska B., Gawlik R. Differential expression of tumor necrosis factor α , interleukin 1 β , nuclear factor κ B in nasal mucosa among chronic rhinosinusitis patients with and without polyps. *Postepy Dermatol. Alergol.*, 2017, Vol. 34, no. 3, pp. 199-206.
27. Russo R.C., Garcia C.C., Teixeira M.M., Amaral F.A. The CXCL8/IL-8 chemokine family and its receptors in inflammatory diseases. *Exp. Rev. Clin. Immunol.*, 2014, Vol. 10, no. 5, pp. 593-619.
28. Shay A.D., Tajudeen B.A. Histopathologic analysis in the diagnosis and management of chronic rhinosinusitis. *Curr. Opin. Otolaryngol. Head Neck Surg.*, 2019, Vol. 27, no. 1, pp. 20-24.
29. Stevens W.W., Peters A.T., Hirsch A.G., Nordberg C.M., Schwartz B.S., Mercer D.G., Mahdavinia M., Grammer L.C., Hulse K.E., Kern R.C., Avila P., Schleimer R.P. Clinical characteristics of patients with chronic rhinosinusitis with nasal polyps, asthma, and aspirin-exacerbated respiratory disease. *J. Allergy Clin. Immunol. Pract.*, 2017, Vol. 5, no. 4, pp. 1061-1070. e3.

30. Takabayashi T., Schleimer R.P. Formation of nasal polyps: The roles of innate type 2 inflammation and deposition of fibrin. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2020, Vol. 145, no. 3, pp. 740-750.
31. Vanderhaegen T., Gengler I., Dendooven A., Chenivresse C., Lefèvre G., Mortuaire G. Eosinophils in the field of nasal polyposis: towards a better understanding of biologic therapies. *Clin. Rev. Allergy Immunol.*, 2021. doi: 10.1007/s12016-021-08844-7.
32. Viksne R.J., Sumeraga G., Pilmane M. Characterization of cytokines and proliferation marker Ki67 in chronic rhinosinusitis with nasal polyps: A pilot study. *Medicina (Kaunas)*, 2021, Vol. 57, no. 6, 607. doi: 10.3390/medicina57060607.
33. Zhao L., Li Y.Y., Li C.W., Chao S.S., Liu J., Nam H.N., Dung N.T.N., Shi L., Wang D.Y. Increase of poorly proliferated p63+/Ki67+ basal cells forming multiple layers in the aberrant remodeled epithelium in nasal polyps. *Allergy*, 2017, Vol. 72, no. 6, pp. 975-984.

Авторы:

Варюшина Е.А. — д.б.н., ведущий научный сотрудник отдела иммунологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Безрукова Е.В. — к.м.н., доцент кафедры оториноларингологии ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова», Санкт-Петербург, Россия

Воробейчиков Е.В. — к.м.н., старший научный сотрудник ООО «Полифарм», Санкт-Петербург, Россия

Authors:

Varyushina E.A., PhD (Biology), Leading Research Associate, Department of Immunology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Bezrukova E.V., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Otorhinolaryngology, I. Mechnikov North-Western State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Vorobeychikov E.V., PhD (Medicine), Senior Research Associate, Polypharm LLC, St. Petersburg, Russian Federation

Кравченко Э.В. — аспирант кафедры оториноларингологии ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова», Санкт-Петербург, Россия

Сухарева Ю.В. — клинический ординатор кафедры оториноларингологии ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова», Санкт-Петербург, Россия

Афитонов М.А. — к.м.н., старший преподаватель кафедры хирургических болезней, заведующий оториноларингологическим отделением клинической больницы ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта», г. Калининград, Россия

Симбирцев А.С. — д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН, главный исследователь ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» Федерального медико-биологического агентства России; профессор кафедры иммунологии ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Kravchenko E.V., Postgraduate Student, Department of Otorhinolaryngology, I. Mechnikov North-Western State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Sukhareva Yu.V., Clinical Resident, Department of Otorhinolaryngology, I. Mechnikov North-Western State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Aflitonov M.A., PhD (Medicine), Senior Lecturer, Department of Surgical Diseases, Head, Department of Otorhinolaryngology at the Clinical Hospital, I. Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation

Simbirtsev A.S., PhD, MD (Medicine), Professor, Corresponding Member, Russian Academy of Science, Chief Research Associate, State Research Institute of Highly Pure Biopreparations; Professor, Department of Immunology, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Поступила 22.02.2022

Отправлена на доработку 23.02.2022

Принята к печати 06.03.2022

Received 22.02.2022

Revision received 23.02.2022

Accepted 06.03.2022

КЛИНИКО-ИММУНОЛОГИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРОГРАММЫ ИММУНОТЕРАПИИ В ПОСЛЕОПЕРАЦИОННОМ ЛЕЧЕНИИ ДЕТЕЙ С РАЗЛИЧНЫМИ ФОРМАМИ ОСТРЫХ ПЕРИТОНИТОВ

Нестерова И.В.^{1,2}, Чудилова Г.А.¹, Чапурина В.Н.¹, Ковалева С.В.¹,
Тетерин Ю.В.¹, Барова Н.К.^{1,3}, Лягуша Д.Э.³, Тараканов В.А.¹

¹ ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ,
г. Краснодар, Россия

² ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», Москва, Россия

³ ГБУЗ «Детская краевая клиническая больница» Министерства здравоохранения Краснодарского края,
г. Краснодар, Россия

Резюме. Одно из самых частых и тяжелых заболеваний в детской абдоминальной хирургии — острый перитонит (ОП). На фоне развития антибиотикоустойчивости и роста числа нетипично протекающих инфекционно-воспалительных заболеваний (ИВЗ) все больше специалистов полагают, что лечение пациентов с данной патологией должно сочетать в себе не только хирургические и этиотропные методы, но и терапию, направленную на коррекцию дефектов функционирования иммунной системы. Нейтрофильные гранулоциты (НГ) — уникальная популяция клеток первой линии противоинфекционной иммунной защиты. Дефекты функционирования НГ при ОП у детей являются определяющими факторами развития, распространенности, тяжести воспалительного процесса в брюшине и чувствительности к проводимой терапии. Особую роль играют функционально значимые субпопуляции НГ, отвечающие за запуск и реализацию фагоцитоза и микробицидных свойств НГ при гнойно-воспалительных процессах у детей. Прослеживается насущная необходимость в разработке новых программ таргетной иммуномодулирующей терапии, направленной на коррекцию дисфункций НГ. Цель исследования — разработать программы иммуномодулирующей терапии в послеоперационном лечении иммунокомпрометированных детей с различными формами острых перитонитов с последующей оценкой их клинико-иммунологической эффективности. В исследование вошло 12 иммунокомпрометированных детей 5–12 лет с ОП различного течения. 1-я группа исследования — пациенты с местным неотграниченным ОП, 2-я группа исследования — дети с разлитым ОП. Группы сравнения составили 6 детей, получавших стандартную терапию (клиническая группа сравнения 1, клиническая группа сравнения 2), сопоставимых по полу, возрасту и диагнозам. В контрольную группу сравнения вошли 18 условно здоровых детей того же возраста. Клиническое обследование включало в себя сбор анамнеза, жалоб, объективный осмотр и оценку клинического течения основного заболевания. Иммунологическое исследование включало: определение рецепторной, фагоцитарной и микробицид-

Адрес для переписки:

Нестерова Ирина Вадимовна
ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов»
117513, Россия, Москва, Ленинский пр., 123-1.
Тел.: 8 (916) 187-73-41.
E-mail: inesterova1@yandex.ru

Address for correspondence:

Nesterova Irina Vadimovna
Peoples' Friendship University of Russia
117513, Russian Federation, Moscow, Leninsky ave., 123-1.
Phone: 7 (916) 187-73-41.
E-mail: inesterova1@yandex.ru

Образец цитирования:

И.В. Нестерова, Г.А. Чудилова, В.Н. Чапурина,
С.В. Ковалева, Ю.В. Тетерин, Н.К. Барова,
Д.Э. Лягуша, В.А. Тараканов «Клинико-
иммунологическая эффективность программы
иммунотерапии в послеоперационном лечении детей
с различными формами острых перитонитов» //
Медицинская иммунология, 2022. Т. 24, № 3. С. 553–572.
doi: 10.15789/1563-0625-CAI-2470
© Нестерова И.В. и соавт., 2022

For citation:

I.V. Nesterova, G.A. Chudilova, V.N. Chapurina,
S.V. Kovaleva, Yu.V. Teterin, N.K. Barova, D.E. Lyagusha,
V.A. Tarakanov "Clinical and immunological efficacy of
immunotherapeutic program after surgical treatment of children
with various forms of acute peritonitis", Medical Immunology
(Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2022, Vol. 24, no. 3,
pp. 553–572.
doi: 10.15789/1563-0625-CAI-2470
DOI: 10.15789/1563-0625-CAI-2470

ной активности НГ, оценку методом проточной цитометрии количества и фенотипа субпопуляций НГ, одномоментно экспрессирующих CD64, CD16, CD32, CD11b с тестированием плотности данных мембранных рецепторов по MFI. Принимая во внимание выявленные в ходе исследования клинические особенности ОП, трансформацию количества и фенотипа субпопуляций НГ, нарушения их эффекторной функции, были разработаны программы таргетной иммуномодулирующей терапии для лечения детей с неотграниченными местными и разлитыми ОП. В стандарты послеоперационного лечения детей с различными формами ОП были включены разные по схеме и длительности курсы лечения препаратом Имунофан (Гексапептид — аргинил-альфа-аспартил-лизил-валил-тирозил-аргинин; ГП). Показана высокая клинико-иммунологическая эффективность разработанных программ. Так, было получено восстановление адекватного функционирования НГ, в том числе показана позитивная реорганизация негативно трансформированных функционально значимых субпопуляций НГ. На этом фоне у детей с нетипично протекающими ОП различного течения отмечен позитивный клинический эффект: отсутствие послеоперационных осложнений, быстрая регрессия симптомов интоксикации и нормализация температуры, сокращение объема антибиотикотерапии и количества койко-дней пребывания в стационаре.

Ключевые слова: нейтрофильные гранулоциты, дисфункции, острый перитонит, гексапептид, иммуномодулирующая терапия, дети

CLINICAL AND IMMUNOLOGICAL EFFICACY OF IMMUNOTHERAPEUTIC PROGRAM AFTER SURGICAL TREATMENT OF CHILDREN WITH VARIOUS FORMS OF ACUTE PERITONITIS

Nesterova I.V.^{a, b}, Chudilova G.A.^a, Chapurina V.N.^a, Kovaleva S.V.^a, Teterin Yu.V.^a, Barova N.K.^{a, c}, Lyagusha D.E.^c, Tarakanov V.A.^a

^a Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation

^b Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russian Federation

^c Pediatric Regional Clinical Hospital, Krasnodar, Russian Federation

Abstract. Acute peritonitis (AP) is among the most frequent and severe conditions in pediatric abdominal surgery. Due to development of antibiotic resistance and increasing number of atypical infectious and inflammatory diseases (IIDs), a lot of specialists suggest combined treatments for these patients which should include not only surgical and etiotropic approaches, as well as therapy aimed at correction of functional defects of immunity. Neutrophilic granulocytes (NGs) reepresent a unique population of cells of primary anti-infectious immune response. Functional NG defects in pediatric AP play a leading role in development, prevalence, severity of peritoneal inflammation, and response to the therapy. Special role is given to functionally significant NG subsets responsible for triggering and implementation of phagocytosis and microbicidal properties of NG in purulent lesions and inflammatory process in children. There is an urgent need for development of new approaches to targeted immunomodulatory therapy in order to correct the NG dysfunction. The aim of the present study was to arrange the programs of immunomodulatory therapy after surgical treatment of immunocompromised children with various forms of acute peritonitis followed by subsequent evaluation of its clinical and immunological efficacy. The study included 12 immunocompromised children aged 5-12 years with different clinical course of acute peritonitis. The study group 1 included patients with local non-restricted AP; study group 2 involved children with diffuse AP. The comparison groups consisted of 6 children who received standard therapy, i.e., clinical comparison groups 1 and 2, matched for sex, age and diagnosis. A control group consisted of 18 conditionally healthy children at similar age. Clinical examination included collection of the patient's history, complaints, objective examination and clinical course assessment of the underlying disease. Immunological study included determination of receptor, phagocytic and microbicidal activity of NCs; assessment of NC subpopulations by their numbers and phenotype using flow cytometry, i.e., the cells co-expressing CD64, CD16, CD32, CD11b, with testing density of these membrane receptors by the

MFI approach. Targeted immunomodulatory therapy programs were applied for treatment of children with unrestricted local and diffuse AP, taking into account clinical features of AP, as well as changes in number and phenotype of NC subpopulations, and impairment of their effector function. The standards of postsurgical treatment in the children with various forms of AP included different courses of treatment with Imunofan (Hexapeptide – arginyl-alpha-aspartyl-lysyl-valyl-tyrosyl-arginine; HP) using different schedules and duration. We have shown high clinical and immunological efficiency of these therapeutic programs. Thus, reversal of adequate NG functioning was observed, including positive rearrangements of negatively transformed functional NG subpopulations. In this respect, a positive clinical effect was noted in children with atypical AP with various clinical courses, i.e., absence of postsurgical complications, rapid regression of intoxication signs, normalization of body temperature, reduced volume of antibiotic therapy and shorter hospitalization terms.

Keywords: neutrophilic granulocytes, dysfunction, acute peritonitis, hexapeptide, immunomodulatory therapy, children

Исследование выполнено в рамках государственного задания Министерства здравоохранения Российской Федерации № 121031000071-4.

Введение

В настоящее время проблема лечения иммунокомпрометированных детей с нетипично протекающими гнойно-воспалительными заболеваниями (ГВЗ), которые характеризуются тяжестью проявлений и неадекватным ответом на антибактериальную терапию, является актуальной и требует своего решения. Несмотря на определенные успехи в лечении острых перитонитов (ОП), как у взрослых, так и у детей, ОП остаются одними из самых сложных ГВЗ. По данным научной литературы смертность при разлитых перитонитах составляет от 30 до 50%, а при развитии полиорганной недостаточности и сепсиса – до 96–100% [3, 6, 14]. Согласно данным мировой статистики, у детей от 6,2 до 25,5% случаев разлитых перитонитов развиваются на фоне острого аппендицита, что связано как со сложностью диагностики нетипичных форм течения заболевания, так и с особенностями детского возраста [4, 16].

Тяжесть и характер течения ОП находятся в прямой зависимости от способности иммунной системы (ИС) реагировать развитием иммунного ответа на внедрение патогена и участвовать в формировании воспалительного процесса той или иной интенсивности. Доказано, что в патогенезе тяжелых ОП большую роль играют имеющиеся у детей нарушения противоинфекционной иммунной защиты, которые усугубляются на фоне нарастающих признаков системного воспаления и интоксикации под действием бактериальных эндотоксинов, нейромедиаторов и тканевых протеаз, а также гиповолемии и изменений активности различных окислительно-восстановительных ферментов [6, 11, 15]. Установлено, что в анамнезе иммунокомпрометированных детей отмечаются повторные ОРВИ с частотой 10–15 и более раз в год, нередко осложняющиеся вторичной бактериальной инфекцией, латентные и рецидивиру-

ющие моно- или микст-герпес-вирусные инфекции, частые обострения хронической патологии ЛОР-органов, тяжелые острые и рецидивирующие хронические бактериальные инфекции различных органов и систем, в том числе упорно рецидивирующие пиодермия и/или фурункулез, часто абсцедирующего характера. Кроме того, показано, что эти дети получают до 6–8 курсов антибактериальной терапии в год, в том числе и парентерально. Все вышеперечисленные особенности являются критериальными клиническими признаками иммунодефицита [8].

Ранее в проведенных нами исследованиях было показано, что в развитии нетипично протекающих ГВЗ решающую роль играют дефекты функционирования клеток первой линии антибактериальной защиты – нейтрофильных гранулоцитов (НГ). НГ осуществляют свои эффекторные функции путем фагоцитоза, дегрануляции, продукции активных форм кислорода (АФК), образования внеклеточных нейтрофильных экстрацеллюлярных сетей (NET). В то же время секрета НГ эктосом, а также множества различных про- и противовоспалительных цитокинов, хемокинов и других медиаторов инициирует регуляцию клеток врожденного и адаптивного иммунитета. При этом НГ в зависимости от микроокружения проявляют свои как активирующие, так и супрессирующие свойства. НГ – популяция самых пластичных клеток ИС, на поверхностной мембране которых насчитывается более 100 видов рецепторов, что позволяет НГ быстро отвечать изменениями их экспрессии на малейшие изменения в их микроокружении. В зависимости от количества и фенотипических возможностей разные субпопуляции НГ могут проявлять различную эффекторную активность. Пластичность НГ позволяет разным субпопуляциям этих клеток под влиянием различных факторов микроокружения легко трансформировать свой фенотип из позитивного в негативный и наоборот. Парадоксально, но такая лабильность НГ может приводить к дефектному неполноценному эффекторному ответу или формированию «состо-

яния неответственности» — блокаде эффекторного ответа, что ассоциировано с неспособностью полноценно осуществлять антибактериальную защиту вследствие несостоятельности фагоцитарной и микробицидной активности, способности формировать NET или запуском ускоренного апоптоза. С другой стороны, гиперактивация НГ может приводить к повреждению различных клеток, тканей и органов, развитию иммуотромбозов, системного васкулита и мультисистемного воспаления [9, 23, 24, 30]. Неадекватное включение НГ в иммунный ответ приводит к развитию нетипично протекающих инфекционно-воспалительных заболеваний, не отвечающих на стандартную терапию [13, 14, 23].

Нами были получены данные, демонстрирующие неадекватное функционирование субпопуляций НГ CD64⁺CD16⁺CD32⁺CD11b⁺ и CD64⁺CD16⁺CD32⁺CD11b⁺, сопряженное с нарушением их эффекторных функций, у детей с нетипично протекающими неотграниченными местными и разлитыми ОП [15].

Немногочисленные литературные данные подтверждают, что применение иммуотропных препаратов, модулирующих активность дефектного противобактериального иммунитета, при ГВЗ оказывает позитивный клинический эффект и улучшает исход заболеваний [2, 5, 12]. Описано позитивное влияние Имунофана на систему фагоцитов при экссудативном среднем отите у детей [7]. Действующей иммуотропной субстанцией препарата Имунофан является гексапептидом (ГП): аргинил-альфа-аспартил-лизил-валил-тирозил-аргинин. ГП — синтетический аналог активного центра гормона тимуса — тимопозитина, который обладает всеми биологическими функциями нативного гормона тимуса. Кроме влияния ГП на индукцию ранней дифференцировки Т-клеток, описаны его дезинтоксикационные, гепатопротекторные, антиоксидантные и иммунорегуляторные свойства, а также способность усиливать эффективность антибактериальной терапии [1, 17]. Также нами было проведено экспериментальное исследование в системе *in vitro*, в котором показаны возможности перепрограммирования под влиянием субстанции ГП трансформированного при бактериальных процессах фенотипа функционально значимых субпопуляций НГ [26]. Это исследование позволило выявить новые иммуномодулирующие эффекты ГП. Полученные данные являются основанием для создания программ иммуномодулирующей терапии с применением ГП для пациентов с различными ГВЗ.

Принимая во внимание изложенное, прослеживается насущная необходимость в разработке новых программ таргетной иммуномодули-

рующей терапии, направленной на коррекцию дисфункций НГ, что должно позволить оптимизировать послеоперационное лечение иммунокомпрометированных детей с различными формами ОП и профилактировать возникновение осложнений.

Цель исследования — разработать программы иммуномодулирующей терапии в послеоперационном лечении иммунокомпрометированных детей с различными формами острых перитонитов с последующей оценкой их клинико-иммунологической эффективности.

Материалы и методы

Проведено проспективное нерандомизированное контролируемое сравнительное исследование. Под нашим наблюдением на базе хирургического отделения № 1 ГБУЗ «Детская краевая клиническая больница» МЗ Краснодарского края находилось 12 детей 5-12 лет (8 мальчиков, 4 девочки) с нетипично протекающими неотграниченными местными ОП (n = 7, группа исследования 1) и нетипично протекающими разлитыми ОП (n = 5, группа исследования 2). В лечении детей, вошедших в группы исследования 1 и 2, использовались стандартные терапевтические подходы к проведению послеоперационной терапии (антибактериальная, инфузионная и дезинтоксикационная терапия, обезболивание и стимуляция кишечника по показаниям), а также дополнительно применялись различные программы иммуномодулирующей терапии, включающие ГП. При разработке программ иммуномодулирующей терапии ГП учитывались возраст пациентов, форма и тяжесть ОП. В клиническую группу сравнения вошли 6 детей того же возраста (3 мальчика и 3 девочки) с ОП, получавшие только традиционную терапию: с диагнозом неотграниченный местный ОП — клиническая группа сравнения 1 (n = 3), с диагнозом разлитой ОП — клиническая группа сравнения 2 (n = 3). Контрольную группу сравнения составили 18 условно здоровых детей (9 мальчиков, 9 девочек) сопоставимых по полу и возрасту. У всех детей, находившихся под нашим наблюдением, был собран анамнез для выявления признаков иммунокомпрометированности по Программе «Иммунологический анамнез», разработанной Нестеровой И.В. (1992).

Иммунологическое исследование периферической крови (ПК) пациентов осуществляли дважды, до и после проводимых курсов комбинированной послеоперационной терапии, оно включало в себя: 1) определение методом проточной цитометрии (FC 500 Beckman Coulter, США) фенотипического профиля функционально значимых субпопуляций НГ с фиксацией количества и плотности экспрессии (MFI) CD64, CD32,

CD16, CD11b рецепторов, с применением конъюгатов соответствующих моноклональных антител (Beckman Coulter International S.A., Франция); 2) оценку поглотительной, киллинговой и переваривающей активности НГ: содержание активно фагоцитирующих клеток (%ФАН); фагоцитарное число (ФЧ) и фагоцитарный индекс (ФИ), процент переваривания (%П), индекс переваривания (ИП); 3) анализ кислородзависимой микробицидной активности (NADPH-оксидаза) НГ в спонтанном и стимулированном в системе *in vitro* NBT-тесте (индукция *S.aureus*, штамм 209) с расчетом % формазан-позитивных клеток (%ФПК), среднего цитохимического индекса – СЦИ, коэффициента мобилизации – КМ: %ФПКст./%ФПКсп.» [10].

Для определения субпопуляций НГ, одновременно экспрессирующих CD16, CD64, CD32 и CD11b рецепторы, использован метод последовательного гейтирования. Для этого на гистограмме FSC-A (прямое светорассеяние) против SSC-A (боковое светорассеяние) выделяют гейт, в котором расположены гранулоциты (первый гейт). Из этого гейта на гистограмме определяют %НГ, несущих CD16⁺CD64⁺ – рецепторы (второй гейт) и CD16⁺CD64⁺ (третий гейт), и регистрируют MFI исследуемых рецепторов. По второму и третьему гейтам гейтируются гистограммы, отражающие содержание НГ, оснащенные CD32 и CD11b ре-

цепторами и их MFI. Шкалы выставлены по изотипическим контролям (рис. 1).

Исследования одобрено этическим комитетом ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» МЗ России, в соответствии с требованиями Хельсинкской декларации с правками от 2013 года и со статьями 20, 22, 23 ФЗ № 323 «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации» от 21.11.2011 г. (ред. от 22.12.2020).

Добровольное информированное согласие на сбор анамнеза, обработку данных истории болезни, забор ПК пациентов, проведение лабораторных исследований и использование иммунотропных препаратов было получено в письменном виде у родителей всех детей, участвовавших в исследовании.

Обработка статистических данных проводилась с помощью компьютерных программ Microsoft Excel 2016 и StatPlus 2017. Проверка на нормальность распределения осуществлялась по количественным показателям с использованием критерия Шапиро–Уилка. Результаты оценивали методами непараметрической статистики, представляли в виде медианы (Me) и интерквартильного размаха ($Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$). Значимость различий между количественными показателями независимых групп определяли по непараметрическим U-критериям Манна–Уитни. Достоверность раз-

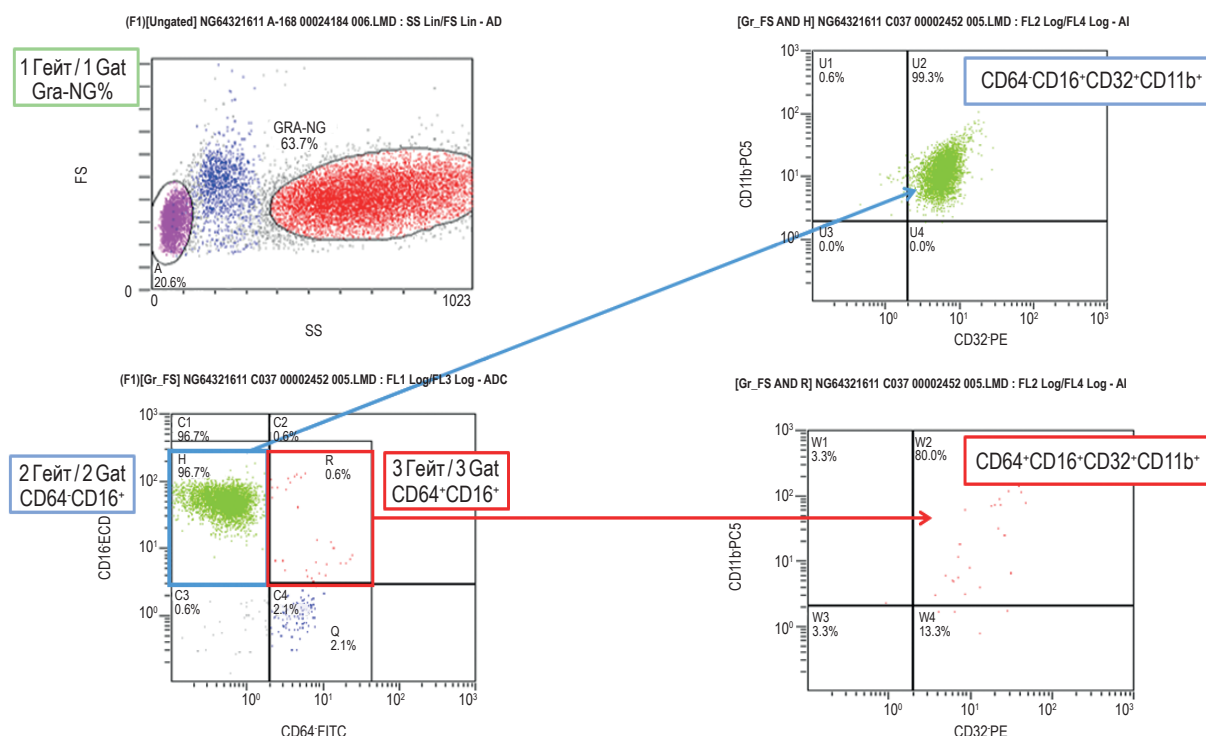


Рисунок 1. Метод последовательного гейтирования определения субпопуляций CD64⁺CD16⁺CD32⁺CD11b⁺НГ и CD64⁺CD16⁺CD32⁺CD11b⁺НГ

Figure 1. Sequential gating method for determining subsets CD64⁺CD16⁺CD32⁺CD11b⁺NG and CD64⁺CD16⁺CD32⁺CD11b⁺NG

линии считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

При анализе анамнестических и клинических данных у детей выявлены признаки иммунокомпрометированности, отражающие несостоятельность работы ИС. Дети группы исследования 1 и клинической группы сравнения 1 переносили более 10 эпизодов ОРВИ в год, длительностью 10 и более дней, осложняющиеся присоединением бактериальных инфекций ЛОР-органов и респираторного тракта до 6 и более раз в год, и нуждались в проведении антибактериальной терапии до 6 и более раз в год. При развитии ОП отмечалась также «плохая отвечаемость» на проводимое хирургическое пособие и стандартную терапию в послеоперационном периоде.

В группе исследования 2 и в клинической группе сравнения 2 у детей с разлитым ОП вирусные инфекции отличались более продолжительным течением острого периода — 14 и более дней, с частотой более 12 эпизодов в год, с присоединением вторичной бактериальной инфекции носоглоточной области с последующим развитием инфекций нижних дыхательных путей более 8 раз в год, с частыми обострениями хронических заболеваний ЛОР-органов, что сопровождалось использованием более 8 раз в год препаратов антибактериальной направленности, в том числе и парентерально. При этом выявлена резистентность на стандартную терапию ОП, проводимую в стационаре.

Иммунологическое исследование ПК детей с разными формами ОП позволило выявить различные дефекты функционирования НГ.

При оценке исследуемых субпопуляций $CD64^+CD16^+CD32^+CD11b^+$ НГ и $CD64^+CD16^+CD32^+CD11b^+$ НГ выявлено изменение их содержания в ПК и различные варианты трансформации фенотипа у детей с ОП различного течения, ассоциированные с негативными изменениями функциональной активности НГ различной степени выраженности.

Так, установлено, что в группе детей с неотграниченным ОП имелось снижение в 1,3 раза количества субпопуляции $CD64^+CD16^+CD32^+CD11b^+$ НГ ($p < 0,05$), увеличение в 42 раза субпопуляции $CD64^+CD16^+CD32^+CD11b^+$ НГ ($p < 0,05$) с измененным фенотипом, характеризующимся высоким MFI по CD16 и CD11b ($p_1 > 0,05$, $p_2 < 0,05$), на фоне нейтрофилии и незначительного лейкоцитоза ($p_{1,2} < 0,05$) (табл. 1). При этом имели место дефекты фагоцитарной и микробицидной NADPH-оксидазной активности. Также выявлено повышение %ФАН ($p < 0,05$), без изменений в процессах захвата бактерий (ФЧ, ФИ, $p_{1,2} > 0,05$),

но с угнетением переваривающей активности НГ (%П, ИП, $p_{1,2} < 0,05$) за счет снижения активации кислородзависимых механизмов (%ФПКсп., СЦИсп., $p_{1,2} > 0,05$), но в то же время с сохранением ответа NADPH-оксидазной активности НГ в нагрузочном NBT-тесте *in vitro* (%ФПКст., СЦИст., $p_{1,2} > 0,05$) в сравнении с соответствующими показателями контрольной группы сравнения (табл. 1).

В группе детей с разлитым ОП зафиксировано незначительное повышение уровня лейкоцитов ($p > 0,05$) и абсолютного количества НГ ($p < 0,05$), неадекватное для тяжелого гнойно-воспалительного процесса. Субпопуляции НГ ПК детей с разлитым ОП отличались более масштабными трансформациями, что выражалось в снижении содержания субпопуляции $CD64^+CD16^+CD32^+CD11b^+$ НГ в 3 раза по сравнению с показателями условно здоровых детей ($p < 0,05$) и в 2,5 раза по отношению к показателям детей группы с неотграниченным ОП ($p < 0,05$). Фенотип данной субпопуляции переопределял ее низкую активность и дискордантность функций, связанные со снижением MFI CD16 ($p < 0,05$), CD32 ($p < 0,05$), CD11b рецепторов ($p_1 > 0,05$). Субпопуляция $CD64^+CD16^+CD32^+CD11b^+$ НГ детей с разлитым ОП возрастала в 100 раз по сравнению с группой условно здоровых детей ($p < 0,05$) и в 2,4 раза относительно группы детей с неотграниченным ОП ($p < 0,05$), также характеризовалась низкой плотностью экспрессии молекул CD16 и CD11b ($p_1 < 0,05$, $p_2 > 0,05$) (табл. 1).

Фагоцитарная активность НГ в этой группе проявлялась отсутствием адекватного увеличения количества активно фагоцитирующих НГ (%ФАН, $p > 0,05$), усилением процессов поглощения (ФЧ, $p > 0,05$), но депрессией процессов переваривания (%П, $p_1 > 0,05$; ИП, $p_2 < 0,05$). При этом отмечалась повышенная микробицидная активность НГ в спонтанном NBT-тесте (%ФПКсп., СЦИсп., $p_{1,2} > 0,05$) с нарушениями активации NADPH-оксидаз в нагрузочном тесте (%ФПКст., СЦИст., $p_{1,2} > 0,05$), что демонстрировало истощение резервных возможностей клетки (табл. 1). У детей с разлитым ОП отмечалась более значимая негативная трансформация функционально значимых субпопуляций НГ и дефектность фагоцитарной и микробицидной функций НГ, что, по-видимому, обуславливало отсутствие адекватного ответа НГ на гнойную инфекцию и способствовало формированию тяжелого разлитого гнойно-воспалительного инфекционного процесса, с потерей возможностей его отграничения.

На основе анализа клинко-анамнестических данных пациентов и с учетом выявленных дефектов в системе НГ у детей с различными ва-

ТАБЛИЦА 1. ОСОБЕННОСТИ НЕГАТИВНОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ ФЕНОТИПА СУБПОПУЛЯЦИЙ CD64⁺CD16⁺CD32⁺CD11b⁺НГ И CD64⁺CD16⁺CD32⁺CD11b⁺НГ И АССОЦИИРОВАННЫЕ С НИМИ ДЕФЕКТЫ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ У ДЕТЕЙ С РАЗЛИЧНЫМИ ФОРМАМИ ОСТРЫХ ПЕРИТОНИТОВ, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 1. FEATURES OF THE NEGATIVE TRANSFORMATION OF THE PHENOTYPE OF SUBSET CD64⁺CD16⁺CD32⁺CD11b⁺NG AND CD64⁺CD16⁺CD32⁺CD11b⁺NG AND ASSOCIATED DEFECTS IN FUNCTIONAL ACTIVITY NEUTROPHILIC GRANULOCYTES IN CHILDREN WITH VARIOUS FORMS OF ACUTE PERITONITIS, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

Группы Groups	Условно здоровые дети Healthy children	Группа детей с неограниченным местным перитонитом Group of children with unrestricted local peritonitis	Группа детей с разлитым перитонитом Group of children with diffuse peritonitis
L	6,4 (5,2-7,4)	12,5 (10,8-19,9)*	8,9 (7,1-9,5)
%НГ / %NG	57,0 (46,0-58,5)	73,0 (61,0-80,0)*	82,0 (75,5-92,3)*
НГабс. / NG abs.	3,6 (2,5-4,3)	9,2 (6,6-15,9)*	7,3 (5,4-8,8)*
CD64⁺CD16⁺CD32⁺CD11b⁺НГ / CD64⁺CD16⁺CD32⁺CD11b⁺NG			
%НГ / %NG	93,3 (91,3-95,2)	74,2 (54,6-84,5)*	29,6 (18,1-45,2)*
MFI CD16	83,7 (79,0-99,3)	99,8 (85,6-105,0)	43,7 (33,5-63,9)*
MFI CD32	6,1 (5,6-9,9)	4,8 (3,8-7,0)	4,6 (4,4-5,5)*
MFI CD11b	17,5 (14,7-21,0)	22,7 (18,3-32,0)	14,5 (11,3-22,3)
CD64⁺CD16⁺CD32⁺CD11b⁺НГ / CD64⁺CD16⁺CD32⁺CD11b⁺NG			
%НГ / %NG	0,6 (0,2-0,7)	25,2 (20,6-31,0)*	60,7 (39,5-81,0)*
MFI CD64	6,1 (4,3-7,0)	2,8 (2,6-3,2)*	2,9 (2,6-3,3)*
MFI CD16	83,4 (70,2-99,3)	98,2 (78,1-125,0)	41,4 (31,4-60,8)*
MFI CD32	9,54 (7,8-15,4)	5,7 (4,6-7,0)*	4,8 (4,2-5,8)*
MFI CD11b	13,3 (8,8-23,5)	29,1 (27,8-39,0)*	16,0 (12,6-24,3)
Оценка фагоцитарной и микробицидной активности НГ Evaluation of phagocytic and microbicidal activity of NG			
%ФАН / %PAN	55,0 (50,0-57,0)	60,0 (62,0-86,0)*	62,0 (51,0-9,0)
ФЧ / PN	4,1 (3,7-5,7)	4,4 (3,0-4,5)	7,5 (4,9-9,6)
ФИ / PI	2,5 (1,9-3,3)	1,8 (1,2-2,1)	2,04 (1,7-2,7)
%П / %D	62,6 (57,9-62,9)	45,3 (39,8-63,8)	44,8 (39,8-50,0)*
ИП / ID	1,6 (1,3-1,9)	0,96 (0,7-1,2)*	1,3 (0,7-1,9)
%ФПК сп / %FPCsp	2,0 (1,0-3,7)	1,4 (1,0-2,8)	12,5 (3,8-1,0)*
СЦИ сп / MCIsp	0,09 (0,06-0,11)	0,05 (0,03-0,16)	0,37 (0,12-0,62)*
%ФПК ст / %FPC st	4,3 (2,5-10,0)	7,5 (5,5-14,0)	4,0 (1,5-14,0)
СЦИ ст / MCI st	0,16 (0,08-0,29)	0,46 (0,14-0,75)	0,12 (0,06-0,40)
КМ / MR	1,9 (1,5-2,5)	2,0 (0,1-2,2)	0,1 (0,03-0,90)*

Примечание. * – различия показателей по сравнению с условно здоровыми детьми (контрольная группа сравнения), p < 0,05.

Note. *, differences in indicators compared with conditionally healthy children (control group of comparison), p < 0.05.

риантами течения ОП, разработаны 2 программы иммуномодулирующей терапии ГП, включенные в комплексное лечение в послеоперационном периоде в соответствии со стандартами (рис. 2).

При оценке эффективности включения иммуномодулирующей терапии с применением ГП в комплексное лечение детей с нетипично протека-

ющими ОП различного течения были выявлены следующие клинические эффекты. У детей группы исследования 1 на фоне стандартного курса антибактериальной терапии через 2 (1,0-2,5) дня после начала использования иммуномодулирующей терапии наблюдались нормализация температурной реакции и регрессия симптомов ин-

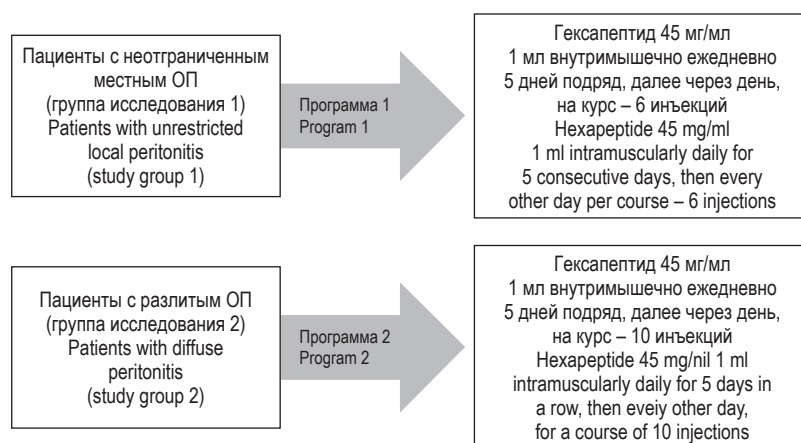


Рисунок 2. Программы иммуномодулирующей терапии с применением Гексапептида в лечении детей с нетипично протекающими острыми перитонитами

Figure 2. Programs of immunomodulatory therapy using Hexapeptide in the treatment of children with atypical acute peritonitis

токсикации в 100% случаев, также отсутствовало нагноение швов, в отличие от клинической группы сравнения 1, в которой отмечались более длительные проявления интоксикации до 5 (4,5-5,0) дней ($p < 0,05$) и выделения гнойного характера из послеоперационной раны до 4 (3,5-4,0) дней ($p < 0,05$).

В группе исследования 2 детей с разлитым ОП отмечалось восстановление температурной реакции и регрессия интоксикации к 4 (3,0-4,5) дню в 100% случаев, тогда как в клинической группе сравнения 2 только к 6 (5,5-6,5) дню пребывания в стационаре ($p < 0,05$). Кроме этого, сокращалось время пребывания детей в реанимационном отделении в 2 раза – с 4 (3,5-4,0) дней (группа сравнения 2, $p < 0,05$) до 2 (1,0-2,5) дней (группа исследования 2). Удаление дренажей было произведено на 3 (2-3) день применения иммуномодулирующей терапии у детей с разлитым ОП в группе исследования 2, что меньше в 1,6 раза сроков удаления дренажей в клинической группе сравнения 2 (5 (4,5-5,0), ($p < 0,05$)). В клинической группе сравнения 2 в 80% случаев наблюдался парез кишечника и его регрессия к 6-м суткам ($p < 0,05$), тогда как в группе исследования 2 парез кишечника не был зарегистрирован.

Позитивные клинические эффекты иммуномодулирующей терапии с включением ГП произошли на фоне позитивной динамики изменений в ИС. Так, иммуномодулирующие эффекты ГП проявились в группе исследования 1 восстановлением содержания НГ субпопуляции $CD64^+CD16^+CD32^+CD11b^+$ (93,68 (92,23-94,9) % до уровня таковых у условно здоровых детей – 93,9 (91,3-95,2) %, ($p > 0,05$) против 74,2 (54,6-84,5) % до лечения ($p < 0,05$). В то время как в группе, на-

ходящейся на стандартной терапии, наблюдалась лишь тенденция к увеличению субпопуляции $CD64^+CD16^+CD32^+CD11b^+$ НГ до 80,1 (51,8-82,8) % после лечения ($p > 0,05$). Фенотип данной субпопуляции после лечения ГП в группе исследования 1 характеризовался увеличением в 1,3 раза плотности экспрессии $CD16$ ($p < 0,05$), снижением MFI $CD32$ ($p < 0,05$) и MFI $CD11b$ ($p > 0,05$) относительно показателей до лечения, тогда как в клинической группе сравнения 1 не отмечалось достоверных изменений экспрессии данных рецепторов (рис. 3А).

На фоне терапии с включением ГП количество НГ субпопуляции $CD64^+CD16^+CD32^+CD11b^+$ в группе исследования 1 значительно уменьшилось в 18 раз относительно показателей до лечения – с 25,2 (20,6-31,0) % до 1,4 (1,17-2,5) % ($p < 0,05$), приблизившись к показателям условно здоровых детей ($p > 0,05$). При этом отмечалось значимое повышение MFI $CD16$ ($p < 0,05$), в 1,8 раза выше показателей условно здоровых детей; увеличение MFI $CD64$ ($p < 0,05$), MFI $CD32$ ($p > 0,05$), снижение MFI $CD11b$ ($p < 0,05$) по сравнению с показателями до лечения. В то же время следует подчеркнуть, что плотность экспрессии по MFI рецепторов $CD64$, $CD16$, $CD11b$ не достигла значений контрольной группы сравнения. В группе, находящейся на стандартной терапии, содержание субпопуляции $CD64^+CD16^+CD32^+CD11b^+$ НГ снизилось лишь в 1,8 раза до 14,0 (12,9-27,9) % ($p > 0,05$), оставаясь значительно выше показателей условно здоровых детей, а фенотипический профиль данной субпопуляции не изменился относительно показателей до лечения ($p > 0,05$) (рис. 3Б).

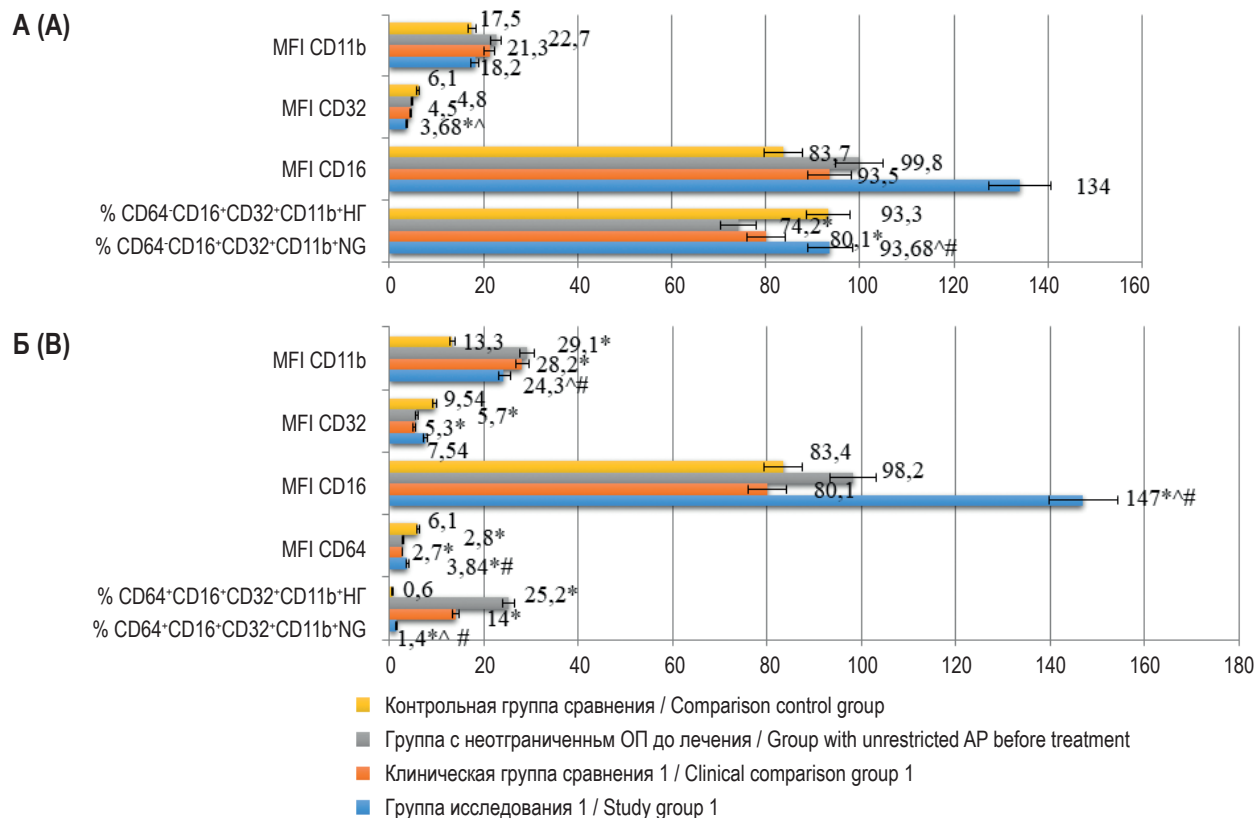


Рисунок 3. Эффекты влияния курса иммуномодулирующей терапии с применением Гексапептида на количество и фенотип субпопуляций CD64⁺CD16⁺CD32⁺CD11b⁺НГ (А) и CD64⁺CD16⁺CD32⁺CD11b⁺НГ (Б) детей с неограниченным местным острым перитонитом

Примечание. * – различия показателей по сравнению с условно здоровыми детьми, $p < 0,05$; ^ – различия показателей до курса иммунотерапии по сравнению с показателями после курса иммунотерапии, $p < 0,05$; # – различия показателей клинической группы сравнения по сравнению с показателями группы исследования, $p < 0,05$.

Figure 3. Effects of the influence of a course of immunomodulatory therapy using Hexapeptide on the number and phenotype of subsets CD64⁺CD16⁺CD32⁺CD11b⁺NG (A) and CD64⁺CD16⁺CD32⁺CD11b⁺NG (B) in children with unlimited local acute peritonitis

Note. *, differences in indicators compared with conditionally healthy children, $p < 0.05$; ^, differences in indicators before the course of immunotherapy compared with those after the course of immunotherapy, $p < 0.05$; #, differences in the indicators of the clinical comparison group compared with the indicators of the study group, $p < 0.05$.

В группе исследования 2 с глубокими дефектами функционирования НГ модулирующие эффекты ГП проявились более ярко. Как и в группе исследования 1, количество НГ субпопуляции CD64⁺CD16⁺CD32⁺CD11b⁺ значительно возросло с 29,6 (18,1–45,2) % до лечения и составило 95,97 (91,94–96,76) % ($p < 0,05$) после лечения, восстановившись до показателей условно здоровых детей – 93,3 (91,3–95,2) %. Установлена переориентация фенотипа этой субпопуляции относительно показателей до лечения: достоверно возросла плотность экспрессии CD11b и CD16 ($p_{1,2} < 0,05$). Количество НГ субпопуляции CD64⁺CD16⁺CD32⁺CD11b⁺ на фоне стандартной терапии увеличилось в 3,2 раза – до 40,1 (20,9–46,9) % ($p < 0,05$), но оставалось значительно ниже показателей условно здоровых детей ($p < 0,05$). При этом уровень экспрессии функционально значимых рецепторов существенно

не менялся по отношению к показателям до лечения (рис. 4А).

Содержание субпопуляции CD64⁺CD16⁺CD32⁺CD11b⁺НГ в ПК детей группы исследования 2 снизилось в 80 раз с 60,7 (39,5–81,0) % до 0,74 (0,48–1,66) % ($p < 0,05$) после лечения, что достигло пределов значений, выявленных у условно здоровых детей. Одновременно на НГ данной субпопуляции увеличилась плотность экспрессии CD16 в 3 раза и CD11b в 1,8 ($p_{1,2} < 0,05$), в то время как плотность экспрессии CD32 оставалась на уровне значений до лечения. Отмечено восстановление до уровня контрольной группы сравнения только MFI CD16. В клинической группе сравнения 2 содержание субпопуляции CD64⁺CD16⁺CD32⁺CD11b⁺НГ и ее фенотипический профиль на фоне стандартного лечения остались в пределах значений этих показателей до лечения ($p > 0,05$) (рис. 4Б).

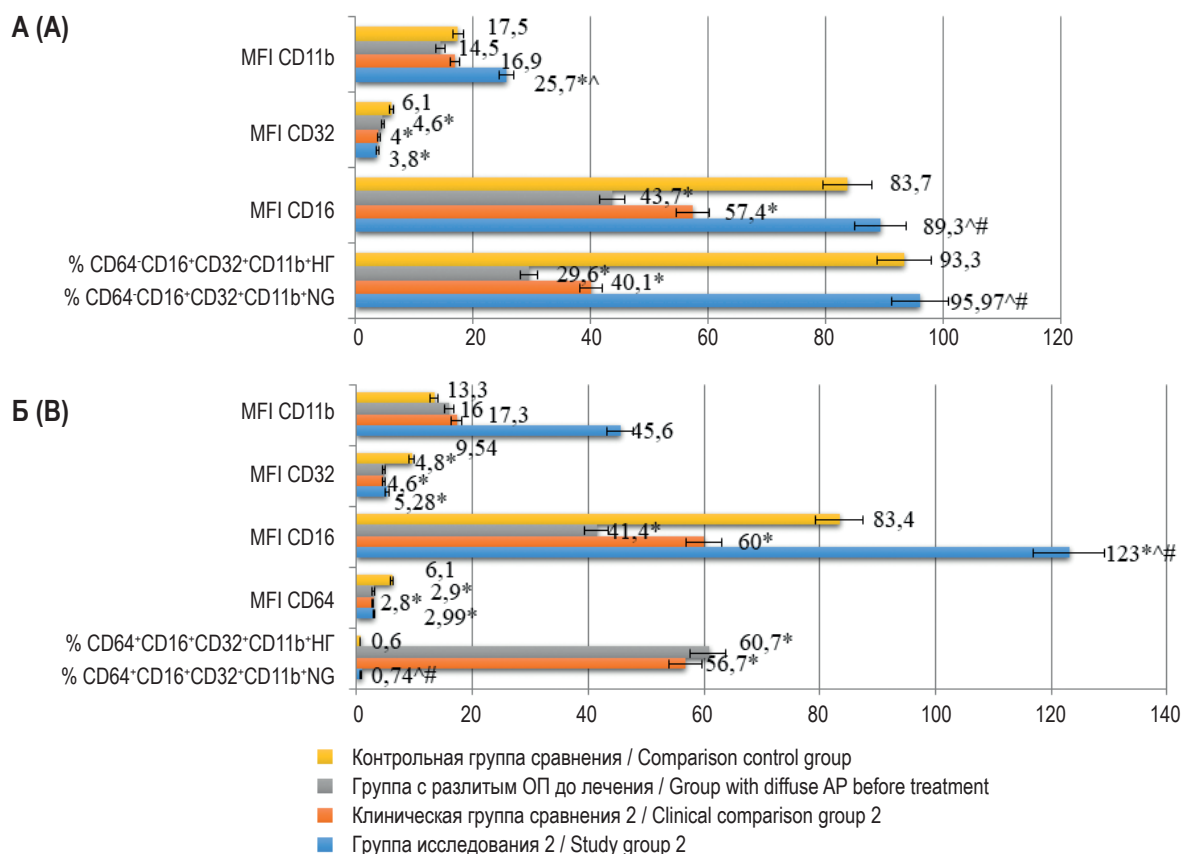


Рисунок 4. Эффекты влияния курса иммуномодулирующей терапии с применением Гексапептида на количество и фенотип субпопуляций CD64⁺CD16⁺CD32⁺CD11b⁺NG (А) и CD64⁺CD16⁺CD32⁺CD11b⁺NG (Б) детей с разлитым острым перитонитом

Примечание. * – различия показателей по сравнению с условно здоровыми детьми, $p < 0,05$; ^ – различия показателей до лечения по сравнению с показателями после лечения, $p < 0,05$; # – различия показателей клинической группы сравнения по сравнению с показателями группы исследования, $p < 0,05$.

Figure 4. Effects of the influence of a course of immunomodulatory therapy using Hexapeptide on the number and phenotype of subsets CD64⁺CD16⁺CD32⁺CD11b⁺NG (A) and CD64⁺CD16⁺CD32⁺CD11b⁺NG (B) in children with generalized acute peritonitis

Note. *, differences in indicators compared with conditionally healthy children, $p < 0.05$; ^, differences in indicators before the course of immunotherapy compared with those after the course of immunotherapy, $p < 0.05$; #, differences in the indicators of the clinical comparison group compared with the indicators of the study group, $p < 0.05$.

Оценка фагоцитарной и микробицидной NADPH-оксидазной активности НГ пациентов групп исследования после проведенного лечения ГП позволила выявить и эффекты восстановления функций НГ. В группе исследования 1 после курса иммуномодулирующей терапии отмечалось восстановление процента активно фагоцитирующих НГ, %ФАН – 56,0 (54,0–60,0) %, с 60,0 (62,0–86,0) % в группе с неотграниченным ОП до лечения ($p > 0,05$), что соответствовало показателям условно здоровых детей; усиление процессов переваривания с 45,3 (39,8–63,8) до лечения против 51,26 (49,08–61,43) (%П, $p > 0,05$) и при этом процессы захвата оставались на прежнем уровне и не отличались от значений до лечения (ФЧ, ФИ, $p_{1,2} > 0,05$). Микробицидная активность в группе исследования 1 характеризовалась значимой активацией NADPH-оксидаз как в спон-

танном (%ФПКсп. – 5 (3,75–7,5) %, %ФПКсп. до лечения – 1,4 (1,0–2,8), $p < 0,05$; СЦИсп. – 0,18 (0,12–0,25), СЦИсп. до лечения – 0,05 (0,03–0,16), $p > 0,05$), так и в стимулированном (%ФПКст. – 17,0 (15,5–18,8) %, %ФПКст. до лечения – 7,5 (5,5–14,0), $p < 0,05$; СЦИст. – 0,49 (0,46–0,53), СЦИст. до лечения – 0,46 (0,14–0,75), $p > 0,05$) NBT-тестах с восстановлением резервных возможностей НГ – КМ 3,25 (2,58–4,375) в сравнении с показателями до лечения – КМ 2,0 (0,1–2,2) ($p < 0,05$).

На фоне традиционной терапии в клинической группе сравнения 1 отмечалось значимое снижение %ФАН до 39,5 (39,0–42,9) % после лечения против 60,0 (62,0–86,0) % до лечения с неизменяющимися показателями, характеризующими процессы поглощения (ФЧ, ФИ) как по отношению к значениям до лечения ($p_{1,2} > 0,05$),

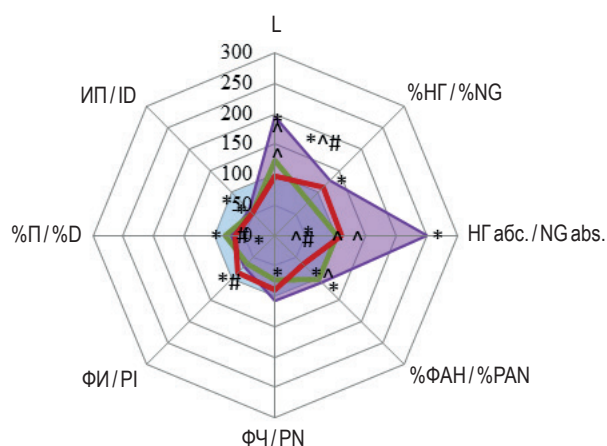
так и условно здоровых детей ($p_{1,2} > 0,05$). В то же время киллинговая активность (%П, ИП) не восстанавливалась и была в 1,5-1,9 раза, соответственно, ниже показателей контрольной группы сравнения. Кроме того, нормализации резервных возможностей НГ к мобилизации NADPH-оксидазной активности не произошло (КМ — 1,0 (0,54-1,2) против 2,0 (0,1-2,2) до лечения и 1,9 (1,5-2,5) в контрольной группе сравнения, $p_{1,2} < 0,05$) (рис. 5)

В группе исследования 2 после проведенного лечения наблюдалось увеличение активно фагоцитирующих НГ (%ФАН — 71,0 (70,0-72,0%) по отношению к показателям до лечения (%ФАН — 62,0 (51,0-69,0) %, $p < 0,05$) и условно здоровых детей (%ФАН — 55,0 (50,0-57,0) %, $p < 0,05$) с тенденцией улучшения процессов захвата (ФЧ, ФИ, $p_{1,2} > 0,05$). Также отмечалось увеличение переваривающей активности НГ, %П — 52,17 (48,72-52,83); ИП — 1,12 (0,76-1,42), по отношению к показателям до лечения (%П — 44,8 (39,8-50,0), $p > 0,05$; ИП — 1,3 (0,7-1,9), $p > 0,05$), не достигающее значений контрольной группы сравнения (%П — 62,6 (57,9-62,9), $p < 0,05$; ИП — 1,6 (1,3-1,9), $p > 0,05$). Нормализовалась до значений

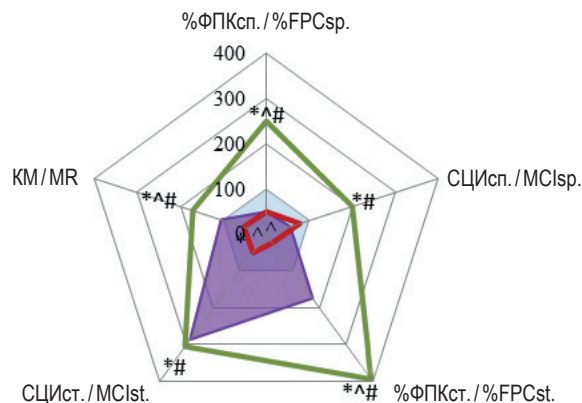
условно здоровых детей чрезмерно повышенная изначально спонтанная NADPH-оксидазная активность (%ФПКсп., СЦИсп., $p_1 < 0,05$, $p_2 > 0,05$) с восстановлением стимулированной продукции NADPH-оксидаз (%ФПКст., СЦИст., $p_{1,2} > 0,05$) и резервных возможностей клетки (КМ — 3,5 (2,00-7,00), КМ — 0,1 (0,03-0,9), $p < 0,05$ до лечения; 1,9 (1,5-2,5) в группе условно здоровых детей, $p > 0,05$).

После проведения стандартной терапии в клинической группе сравнения 2 отмечались однонаправленные изменения, выявленные при анализе показателей фагоцитарной и микробицидной активности клинической группы сравнения 1: снижение %ФАН в 1,5 раза ($p < 0,05$) и отсутствие положительной динамики по восстановлению переваривающей способности НГ в сравнении с показателями до лечения (%П, ИП, $p_{1,2} > 0,05$). Активность NADPH-оксидаз в стимулированном NBT-тесте демонстрировала истощение резервной микробицидной активности (КМ — 1,05 (0,84-1,3) против 0,1 (0,03-0,9) до лечения и 1,9 (1,5-2,5) в контрольной группе сравнения, $p_{1,2} < 0,05$) (рис. 6).

А (А)



Б (В)



- Контрольная группа сравнения / Comparison control group
- Группа с неограниченным ОП до лечения / Group with unrestricted AP before treatment
- Группа исследования 1 / Study group 1
- Клиническая группа сравнения 1 / Clinical comparison group 1

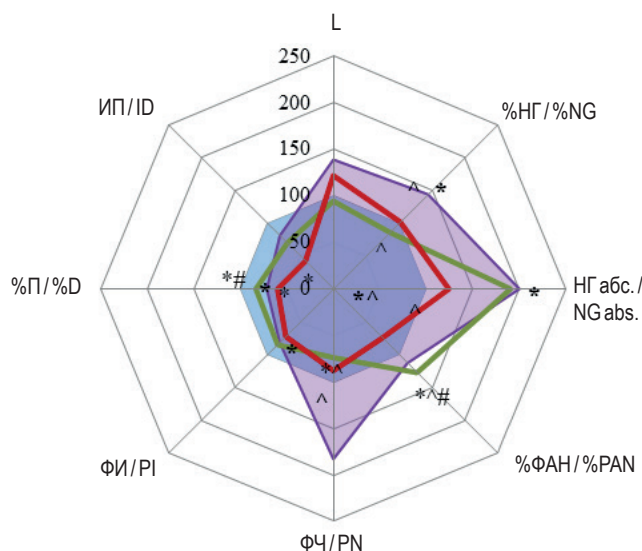
Рисунок 5. Особенности фагоцитарной (А) и микробицидной активности НГ (Б) у детей с неограниченным местным острым перитонитом на фоне комплексного лечения (процент от контрольной группы сравнения)

Примечание. См. примечание к рисунку 4.

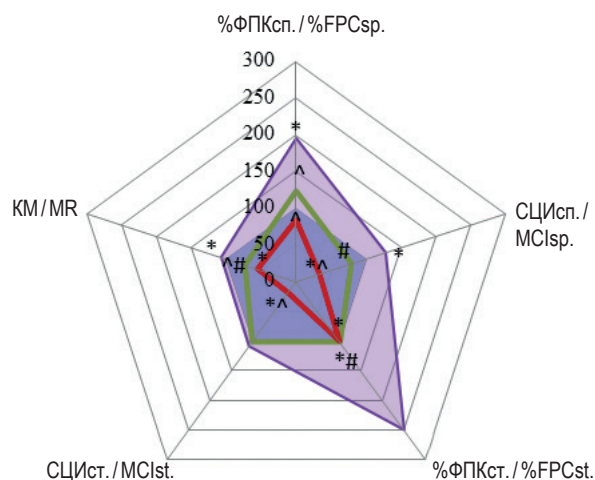
Figure 5. Features of phagocytic (A) and microbicidal activity of NG (B) in children with unrestricted local acute peritonitis against the background of complex treatment (percentage of the control comparison group)

Note. As for Figure 4.

А (А)



Б (Б)



- Контрольная группа сравнения / Comparison control group
- Группа с разлитым ОП до лечения / Group with diffuse AP before treatment
- Группа исследования 2 / Study group 2
- Клиническая группа сравнения 2 / Clinical comparison group 2

Рисунок 6. Особенности фагоцитарной (А) и микробицидной активности НГ (Б) у детей с разлитым острым перитонитом на фоне комплексного лечения с включением иммуномодулирующей терапии (процент от контрольной группы сравнения)

Примечание. См. примечание к рисунку 4.

Figure 6. Features of phagocytic (A) and microbicidal activity of NG (B) in children with generalized acute peritonitis on the background of complex treatment with the inclusion of immunomodulatory therapy (percentage of the control comparison group)

Note. As for Figure 4.

Клинический пример: ребенок М., 8 лет, поступил в хирургическое отделение № 1 ГБУЗ ДККБ МЗ КК 28.09.20 г. с диагнозом «острый аппендицит». Перитонит? Общее состояние средней тяжести. Т – 38,2 °С. Отмечался выраженный интоксикационный синдром. По данным анамнеза имели место критерияльные признаки иммунодефицита в течение последних 5 лет: частые ОРВИ до 10 раз в год продолжительностью более 14 дней, осложняющиеся присоединением бактериальной инфекции нижних дыхательных путей, обострения в 1-2 месяца ВПГ1/2 типа инфекции, лабиальной локализации. Имело место частое использование антибактериальной терапии – до 6-8 курсов в год.

Диагноз: гангренозно-перфорированный аппендицит. Разлитой фиброзно-гнойный перитонит. Проведена аппендэктомия, ревизия брюшной полости.

Послеоперационная терапия включала антибиотикотерапию энтапеном 1,0 × 1 р. в/в, ванкомицин 500 мг 3 раза в день внутривенно – 16 дней, инфузионная терапия, имунофан 45 мг/мл

1 мл в/м ежедневно 5 дней подряд, далее через день, на курс 10 инъекций.

Получена позитивная клинко-иммунологическая эффективность комплексного послеоперационного лечения: Нормализация температурной реакции и регрессия симптомов интоксикации произошла к 4-му дню. В реанимационном отделении ребенок находился 3 суток, дренажи удалены на 3-и сутки. Послеоперационных осложнений не наблюдалось.

Характеристика функционально значимых субпопуляций НГ при поступлении пациента: уровень CD64⁺CD16⁺CD32⁺CD11b⁺ – 25,5%, MFI CD16 – 51, MFI CD32 – 5,31, MFI CD11b – 15,6. CD64⁺CD16⁺CD32⁺CD11b⁺ – 72,1%, что в 90 раз выше показателей условно здорового ребенка, MFI CD64 – 5,76, MFI CD16 – 60,8, MFI CD32 – 4,74, MFI CD11b – 17,5 (рис. 7А, Б.)

Характеристика функционально значимых субпопуляций НГ после лечения: уровень CD64⁺CD16⁺CD32⁺CD11b⁺ – 97,4%, восстановился до уровня условно здоровых детей, MFI CD16 – 90,6 и MFI CD11b – 25,5, увеличились относи-

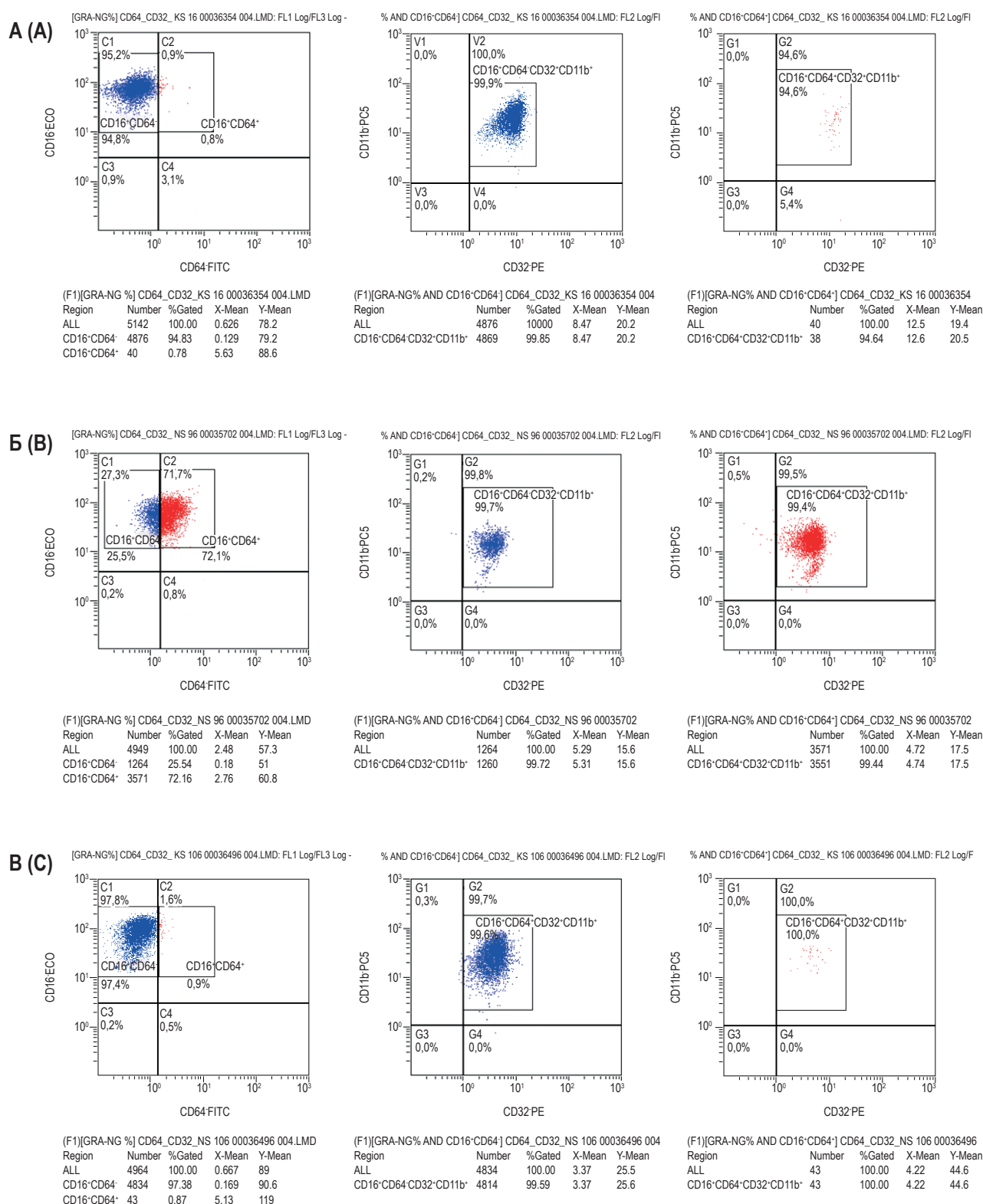


Рисунок 7. Гистограммы, выявленные особенности функционально значимых субпопуляций CD64⁺CD16⁺CD32⁺CD11b⁺ и CD64⁺CD16⁺CD32⁺CD11b⁺НГ и плотность экспрессии рецепторов (MFI) условно здорового ребенка (А), пациента М. до лечения (Б) и после курса таргетной иммуномодулирующей терапии (В)

Figure 7. Histograms, identified features of functionally significant subsets of CD64⁺CD16⁺CD32⁺CD11b⁺ and CD64⁺CD16⁺CD32⁺CD11b⁺NG and receptor expression density (MFI) of a conditionally healthy child (A), patient M. before treatment (B) and after a course of targeted immunomodulatory therapy (C)

тельно показателей до лечения и условно здоровых детей, MFI CD32 — 3,4, снизился в сравнении с показателями условно здоровых детей и показателями до лечения. CD64⁺CD16⁺CD32⁺CD11b⁺ — 0,9%, уровень НГ данной субпопуляции снизился до показателей условно здоровых детей, при этом MFI CD64 — 5,13, MFI CD16 — 119 и MFI CD11b — 44,6 увеличилась, MFI CD32 — 4,22 не менялась (рис. 7).

Таким образом, в результате исследования выявлены позитивные клинко-иммунологические эффекты разработанных программ иммуномодулирующей терапии, включенных в комплексное лечение детей с различными формами нетипично протекающих ОП. Показано, что включение различных программ ГП в комплексное послеоперационное лечение позволило восстановить адекватность работы НГ за счет позитивного ремоделирования трансформированных функционально значимых субпопуляций НГ и восстановления их функциональной активности, что привело к уменьшению длительности лихорадочного периода, проявлений интоксикации, продолжительности интенсивной терапии, способствовало предотвращению развития ранних послеоперационных осложнений — нагноения швов или сокращения длительности дренирования брюшной полости. В то же время только стандартная терапия не приводила к восстановлению нормального функционирования НГ. В соответствии с полученными данными сохранялась дефектность функционирования НГ, что в дальнейшем может приводить к существенному снижению противоинфекционной иммунной защиты, прежде всего при гнойных бактериальных инфекциях. Выявленные иммуномодулирующие эффекты ГП обуславливают целесообразность использования разработанных программ таргетной иммуномодулирующей терапии, направленной на ремодулирование негативно трансформированных функционально значимых субпопуляций НГ, восстановление их функциональной активности, а следовательно, и эффекторных функций в комплексном послеоперационном лечении различных форм ОП.

Обсуждение

Активация НГ представляет собой важный механизм, посредством которого НГ опосредуют свою противоинфекционную активность *in vivo* в отношении вторгающихся патогенов. В реализации эффекторных функций и регуляторных влияний функционально значимых субпопуляций НГ CD64⁺CD32⁺CD16⁺CD11b⁺НГ, CD64⁺CD32⁺CD16⁺CD11b⁺НГ, большую роль играет количество экспрессируемых мембранных рецепторов FcγRs и CD11b и их кооперация.

CD64 (FcγRI) является единственным рецептором FcγR человека с высокой аффинностью к моновалентному IgG. CD64 конститутивно экспрессируется на ранних стадиях гранулоцитопоза, а на зрелых и неактивированных НГ он представлен на очень низком уровне. В то же время CD64 хранится внутри НГ и мобилизуется на поверхность при праймировании, в частности под влиянием провоспалительных цитокинов IL-6, IL-8, G-CSF, IFNγ. Количество НГ, экспрессирующих CD64 повышается при острых бактериальных процессах, являясь их маркером. CD64 считается цитоактивирующим рецептором, при его связывании с моновалентным IgG, опсонизирующим бактерии, индуцируются фагоцитоз, высвобождение медиаторов воспаления, активация NADPH-оксидаз и образование АФК, синтез и секреция провоспалительных цитокинов, запуск АЗКЦ НГ, а также сложного набора активирующих и ингибирующих эффектов [18, 20, 33].

CD32 (FcγRIIa) низкоаффинный рецептор для IgG на мембранной поверхности НГ в CD32 опосредует эндоцитоз, стимуляцию секреторной активности, цитотоксических механизмов и иммуномодулирующих функций НГ, в ответ на патогены или цитокины запускает активацию сборки NADPH-оксидазного комплекса [28].

CD16 (FcγRIIIb) — низкоаффинный рецептор с низким сродством к IgG, отвечающий за цитотоксическую функцию НГ. Связывание CD32 и CD16, а также соединение CD16 с IgG инициирует сигнальные каскады, которые продуцируют разнообразные ответы, включая АЗКЦ, фагоцитоз, дегрануляцию, кислородный взрыв и пролиферацию [19]. Высокая экспрессия молекул CD16, свидетельствует о повышенной функциональной активности НГ. Снижение или отсутствие CD16 на мембранной поверхности НГ может указывать на незрелость НГ и/или на «обратную дифференцировку» НГ, приводящую к возникновению бактериальной инфекции [19]. В то же время показано, что рецептор CD16 способен функционировать совместно с CD11b/CD18 рецептором и усиливать FcγRII-опосредованную интернализацию.

CD11b (Mac-1, CR3b) — α-субъединица молекулы адгезии β2-интегрина, трансмембранный гетеродимерный рецептор для CR3b компонента комплемента. CD11b способствует устойчивому прикреплению НГ к эндотелию, их трансэндотелиальной миграции в локусы воспаления. Повышение уровня экспрессии молекул CD11b НГ наблюдается при различных инфекциях и является свидетельством активации НГ [31]. CD11b — сигнальный партнер для FcγRs. Он связан с актиновым цитоскелетом НГ и сигнальными белками, способен регулировать хемотаксис, миграцию,

адгезию, фагоцитоз, респираторный взрыв и де-грануляцию НГ. Нарушение экспрессии CD11b на НГ нарушает регуляторные механизмы ИС. Блокирование CD11b приводит к дефекту активации FcγRs и нарушению фагоцитарной функции НГ [27].

Сравнительный анализ трансформации функционально значимых субпопуляций НГ при неотграниченном местном и разлитом ОП выявил существенные различия. Так, %НГ «сторожевой» субпопуляции CD64⁺CD16⁺CD32⁺CD11b⁺ у детей с неотграниченным местным ОП уменьшился в 1,28 раза (на 19,1%), а при разлитом ОП %НГ снизился более значительно — в 3,15 раза (на 63,7%) по сравнению с показателями условно здоровых детей. Показано, что при более тяжелой форме ОП % субпопуляции CD64⁺CD16⁺CD32⁺CD11b⁺НГ уменьшился более существенно по сравнению с более легкой формой — в 2,5 раза. При этом при разлитом ОП отмечено значительное снижение плотности экспрессии активационного рецептора CD16 по сравнению с условно здоровыми детьми и с детьми с неотграниченным местным ОП, соответственно в 1,99 и в 2,37 раза и плотности экспрессии рецептора CD32, соответственно, в 1,67 и 1,99 раза. Полученные данные свидетельствуют о дефиците «сторожевой» субпопуляции CD64⁺CD16⁺CD32⁺CD11b⁺НГ и негативной трансформации ее фенотипа при различных формах ОП у детей, более выраженных при разлитом ОП.

При различных формах ОП у детей статистически значимо увеличивалось содержание субпопуляции CD64⁺CD16⁺CD32⁺CD11b⁺НГ, позитивной по CD64-рецептору. У условно здоровых детей он составляла лишь 0,6 (0,2-0,7) %. При неотграниченном местном ОП уровень этой субпопуляции достоверно увеличивался в 42 раза до 25,2 (20,6-31,0) %, а при разлитом ОП — в 101,2 раза до 60,7 (39,5-81,0) %. Плотность экспрессии CD64-рецептора по MFI на мембране CD64-позитивных НГ, достоверно снижена, как при местном неотграниченном ОП, так и при разлитом перитоните по сравнению с условно здоровыми детьми в 2,18 и в 2,10, соответственно. Плотность экспрессии активационного рецептора CD16 по MFI не изменялась при местном неотграниченном ОП и снижалась более чем в 2 раза — при разлитом ОП по сравнению с группой условно здоровых детей. Плотность экспрессии мембранного CD32 по MFI достоверно снижена, как при местном неотграниченном, так и при разлитом ОП, соответственно, в 1,7 и в 1,99 раза по сравнению с группой сравнения. Уровень плотности активационного рецептора CD11b значительно, в 2,19 раза, увеличился при местном неотграниченном ОП и практически не

менялся при разлитом ОП по сравнению с условно здоровыми детьми.

С нашей точки зрения, появление в ПК «незрелой» субпопуляции CD64⁺CD16⁺CD32⁺CD11b⁺НГ является свидетельством присутствия большого количества еще одной дефектной негативно трансформированной субпопуляции со сниженным эффекторным потенциалом. При этом при более тяжелой форме ОП — разлитом ОП наблюдается более значительное увеличение количества «незрелой» субпопуляции CD64⁺CD16⁺CD32⁺CD11b⁺НГ, дефицит «сторожевой» субпопуляции CD64⁺CD16⁺CD32⁺CD11b⁺НГ, что ассоциировано с более выраженным нарушением экспрессии активационных маркеров и значительными нарушениями фагоцитарной, киллинговой и микробицидной оксидазной функциями НГ.

Выбор ГП для проведения таргетной иммуномодулирующей терапии был связан с несколькими причинами. Во-первых, в настоящее время показано, что субстанция, входящая, как основное действующее вещество в состав Имунотана, ГП — это синтетический аналог активного центра гормона тимуса тимопоетина. Ранее полагали, что тимопэтин способен связываться с никотиновыми ацетилхолиновыми рецепторами (NACHR) нейронального типа и оказывать физиологические эффекты влияния на клетки ИС, в первую очередь на Т-лимфоциты и клетки нейронального типа [32]. Позднее NACHR, представляющие собой пентамерные катионные каналы, были также обнаружены на трех типах лейкоцитарных гранулоцитарных клеток: НГ, базофилах и эозинофилах [25]. При воздействии на NACHR НГ мышей в условиях эксперимента показано модулирование функциональной активности НГ [29]. Второй вариант воздействия ГП на НГ — связывание с молекулами ГКГС II типа — HLA-DR. Кроме того, получены убедительные данные, свидетельствующие о прямом связывании пентапептида гормона тимуса тимопоетина — Тимопентина (TP5) — синтетического аналога активного центра тимопоетина, с молекулами ГКГС II типа — HLA-DR. Возможность такого связывания доказана в экспериментальном исследовании свойств TP5, когда было продемонстрировано прямое связывание флуоресцентно меченого TP5 с HLA-DR, а специфичность связывания подтверждена ингибированием немеченым TP5. Молекулярный анализ дополнил это открытие об изменении сайта связывания в бороздке HLA-DR с валином (Val), который играет роль якоря 1-го типа, необходимого для связывания TP5 с HLA-DR [22]. При этом следует подчеркнуть молекулярное сходство Гексапептида — Arginyl-alpha-Aspartyl-Lysyl-Valyl-Tyrosyl-Arginine и Тимопентина — Arginyl-Lysyl-

Asptyl-Valyl-Tyrosil, которые имеют в своих молекулах Valyl. Приведенные выше доказательства, свидетельствуют о существовании двух путей рецепторного связывания ГП и НГ: связывания с HLA-DR и с NACH. Во-вторых, при проведении экспериментальных исследований *in vitro* нами ранее была показана возможность перепрограммирования под влиянием субстанции ГП трансформированного при бактериальных процессах фенотипа функционально значимых субпопуляций НГ CD64⁺CD32⁺CD16⁺CD11b⁺НГ, CD64⁺CD32⁺CD16⁺CD11b⁺НГ [26]. Все вышеизложенное явилось основанием для создания программ иммуномодулирующей терапии с применением ГП для детей с различными формами ОП.

Применение у детей с неотграниченной местной формой ОП созданной нами программы 1 таргетной иммуномодулирующей терапии ГП продемонстрировало позитивную иммунологическую эффективность: восстановилось до уровня условно здоровых детей количество НГ «сторожевой» субпопуляции CD64⁺CD16⁺CD32⁺CD11b⁺, значительно повысилась плотность экспрессии активационного маркера CD16, достоверно превысив уровень такового не только до лечения, но и относительно контрольной группы сравнения, соответственно, 134 (96,3-145) против 99,8 (85,6-105,0) до лечения и против 83,7 (79,0-99,3) в группе условно здоровых детей, наблюдались тенденции к снижению MFI CD32 ($p > 0,05$), при этом уровень MFI CD11b не менялся.

При разлитом ОП применение программы иммунотерапии 2 с использованием ГП продемонстрировало полное достоверное восстановление количества НГ «сторожевой» субпопуляции CD64⁺CD16⁺CD32⁺CD11b⁺, которое увеличилось в 3,24 раза и достигло уровня условно здоровых детей. При этом достоверно восстановилась до уровня контрольной группы сравнения плотность экспрессии активационного маркера CD16, уровень которого вырос в 2,04 раза, а плотность экспрессии активационного рецептора CD11b достоверно увеличилась до 25,70 (22,5-28,40) против 14,5 (11,3-22,3) до лечения и 17,5 (14,7-21,0) в контрольной группе сравнения.

Применение у детей с неотграниченной местной формой ОП созданной нами программы 1 таргетной иммуномодулирующей терапии ГП продемонстрировало позитивную иммунологическую эффективность относительно «незрелой» дефектной субпопуляции CD64⁺CD16⁺CD32⁺CD11b⁺: ее количество достоверно снизилось в 18 раз, практически достигнув уровня условно здоровых детей. Повысилась плотность экспрессии активационного маркера CD16, достоверно превысив уровень такового

не только до лечения, но и в контрольной группе сравнения, соответственно, 147 (124,5-165,5) против 99,2 (78,1-124,0) до лечения и против 83,4 (70,2-99,3) в группе условно здоровых детей. Наблюдалась тенденция к повышению плотности экспрессии CD32 ($p > 0,05$), при этом уровень MFI CD11b, практически не изменился.

При разлитом ОП применение программы иммунотерапии 2 с использованием ГП продемонстрировало достоверное уменьшение количества НГ «незрелой» дефектной субпопуляции CD64⁺CD16⁺CD32⁺CD11b⁺. Количество CD64⁺CD16⁺CD32⁺CD11b⁺ значительно снизилось в 82,0 раза с 60,7 (39,5-81,0) % до 0,74 (0,48-1,66) % и практически достигло уровня условно здоровых детей. При этом достоверно восстановилась до уровня контрольной группы сравнения плотность экспрессии активационного маркера CD16, уровень которого вырос на фоне лечения ГП – в 2,98 раза, а MFI активационного рецептора CD11b достоверно увеличилась до 45,60 (21,9-47) против 16,0 (12,6-24,3) до лечения и 17,5 (14,7-21,0) в группе сравнения.

Полученные результаты применения 2 программ иммуномодулирующей терапии с применением разных по длительности курсов ГП при местном неотграниченном и разлитом ОП, продемонстрировали позитивную клиническую и иммунологическую эффективность, обусловленную таргетным влиянием ГП, восстановившим не только количество активной зрелой мажорной «сторожевой» субпопуляции CD64⁺CD16⁺CD32⁺CD11b⁺ и плотность экспрессии активационных маркеров CD16 и CD11b, но и способствовавшим значительному уменьшению количества незрелой дефектной субпопуляции CD64⁺CD16⁺CD32⁺CD11b⁺ с параллельным восстановлением плотности экспрессии активационных маркеров CD16 и CD11b. Позитивное ремодулирование 2 функционально значимых субпопуляций способствовало восстановлению противоинфекционной защиты против грамотрицательных бактерий, о чем свидетельствует восстановление адекватности функционирования фагоцитарной и микробицидной функций.

Не вызывает сомнения, что важную роль в реализации эффекторных функций и регуляторных влияний функционально значимых субпопуляций НГ CD64⁺CD32⁺CD16⁺CD11b⁺НГ, CD64⁺CD32⁺CD16⁺CD11b⁺НГ играет кооперация рецепторов FcγRs и CD11b, разнонаправленное повышение, нарушение или понижение экспрессии которых может активировать или нарушать их взаимодействие и в то же время усиливать или ослаблять действие друг друга, что происходит при развитии различных форм ОП у детей. При этом количественный дефи-

цит и фенотипические нарушения «сторожевой» субпопуляции CD64⁺CD32⁺CD16⁺CD11b⁺НГ и гиперпродукция «незрелой» субпопуляции CD64⁺CD32⁺CD16⁺CD11b⁺НГ, позитивной по CD64, с дисрегуляцией экспрессии активационных маркеров CD16 и CD11b, обуславливали нарушение эффекторных функций НГ и тяжесть течения острого перитонита, более выраженные при ОП. Применение различных по длительности 2 программ иммуномодулирующей терапии с включением ГП при разных формах ОП позволило восстановить количество субпопуляций CD64⁺CD32⁺CD16⁺CD11b⁺НГ, CD64⁺CD32⁺CD16⁺CD11b⁺НГ и их фенотип, плотность экспрессии активационных рецепторов CD16 и CD11b в обеих субпопуляциях, оптимизировать фагоцитарную и микробицидную оксидазную активность и на этом фоне улучшить клиническую эффективность проводимого в послеоперационном периоде лечения.

Заключение

Нетипично протекающие гнойно-воспалительные заболевания получают все большую распространенность среди населения, в связи с ростом дефектов функционирования ИС, самые частые из которых приходится на дисфункции НГ. Выявление вариантов трансформации фенотипов субпопуляций НГ при нетипично протекающих ГВЗ, с определением плотности экспрессии каждого рецептора, представляет новый подход к определению функциональной активности НГ, позволяющий оценить адекватность или дефектность их участия в процессе воспаления. При этом возможности переориентации трансформированных фенотипов клетки — новое

иммунотерапевтическое направление в лечении детей с нетипично протекающими ГВЗ.

Разработанные программы таргетной иммуномодулирующей терапии для лечения детей с неотграниченными местными и разлитыми ОП, не отвечающие на традиционную терапию, показали положительную клинико-иммунологическую эффективность. Включение в послеоперационное лечение детей групп исследования таргетной иммуномодулирующей терапии с применением Гексапептида привело к реорганизации негативно трансформированного рецепторного аппарата функционально значимых субпопуляций НГ и восстановлению способности НГ адекватно выполнять свои функции. Компенсация иммунологических нарушений позитивно повлияла на клинические проявления различных форм ОП: отсутствовали осложнения в послеоперационном периоде, отмечалась быстрая нормализация Т и регрессия симптомов интоксикации, уменьшился объем антибактериальной терапии, сократилось количество койко-дней, а, следовательно, и снизилась длительность пребывания детей с различными формами острых ОП в стационаре.

Мы полагаем, что для достижения более стойких позитивных клинических и иммунологических эффектов при различных формах ОП, в частности при выраженной негативной трансформации фенотипа функционально значимых субпопуляций НГ и дефектах их эффекторных функций на фоне дисбаланса функциональной фагоцитарной и микробицидной активности оправдано использование различных программ таргетной иммуномодулирующей терапии ГП, являющегося активной субстанцией препарата Имунофан.

Список литературы / References

1. Безруков С.Г., Балабанцева А.Н., Григорьева Т.С., Яковенко В.В. Клинико-термографическая оценка эффективности периоперационной терапии раневого процесса у хирургических стоматологических больных с использованием препаратов Вобензим и Имунофан // Таврический медико-биологический вестник, 2017. Т. 20, № 4. С. 10-15. [Bezrukov S.G., Balabantseva A.N., Grigoreva T.S., Iakovenko V.V. Clinical and thermographical evaluation of the efficiency of treating the wound process in surgical stomatology with use of Wobenzym and Imunofan. *Tavrisheskiy mediko-biologicheskiy vestnik = Tauride Medical and Biological Bulletin*, 2017, Vol. 20, no. 4, pp. 10-15. (In Russ.)]
2. Бурков И.В., Царегородцев А.Д., Коренькова С.И. Эффективность препарата галавит при внутримышечном введении у детей старше 6 лет с гнойными хирургическими заболеваниями // Российский вестник перинатологии и педиатрии, 2008. Т. 4. С. 78-83. [Burkov I.V., Tsaregorodtsev A.D., Korenkova S.I. Efficacy of intramuscular galavit in children aged above 6 years who have purulent surgical diseases. *Rossiyskiy vestnik perinatologii i pediatrii = Russian Bulletin of Perinatology and Pediatrics*, 2008, Vol. 4, pp. 78-83. (In Russ.)]
3. Власов А.П., Аль-Кубайси Ш., Власова Т.И., Лещанкина Н.Ю., Окунев Н.А., Шейранов Н.С., Полозова Э.И. Состояние системы гемостаза при остром тяжелом перитоните на фоне терапии Ремаксолом // Хирургия. Журнал им. Н.И. Пирогова, 2019. Т. 2. С. 65-71. [Vlasov A.P., Al-Kubaysi Sh., Vlasova T.I., Leshchankina N.Yu., Okunev N.A., Sheyranov N.S., Polozova E.I. The condition of the hemostatic system in acute severe peritonitis during remaxol therapy (in Russian only). *Khirurgiya. Zhurnal im. N.I. Pirogova = Surgery. N. Pirogov Journal*. 2019, Vol. 2, pp. 65-71. (In Russ.)]

4. Гисак С.Н., Склярлова Е.А., Вечеркин В.А., Черных А.В., Малеев Ю.В., Птицын В.А., Лунев Б.В., Баранов Д.А., Шестаков А.А., Коряшкин П.В. Современные возбудители гнойного перитонита при перфорации желудка или тонкого и толстого кишечника у детей и оптимизация дифференцированного лечения больных // Детская хирургия, 2018. Т. 22, № 2. С. 65-72. [Gisak S.N., Sklyarova E.A., Vecherkin V.A., Chernykh A.V., Maleev Yu.V., Ptitsyn V.A., Lunev B.V., Baranov D.A., Shestakov A.A., Koryashkin P.V. Modern causative pathogens of peritonitis in cases of the perforation of the stomach, small intestine or colon in children and optimization of the differentiated treatment of patients. *Detskaya khirurgiya = Russian Journal of Pediatric Surgery*, 2018, Vol. 22, no. 2, pp. 65-72. (In Russ.)]
5. Карсонова М.И., Пинегин Б.В., Хаитов Р.М. Иммунокорригирующая терапия при хирургической инфекции // Анналы хирургической гепатологии, 1999. Т. 4, № 1. С. 88-96. [Karsonova M.I., Pinegin B.V., Khaitov R.M. Immunocorrecting therapy in surgical infection. *Annaly khirurgicheskoy gepatologii = Annals of HPB Surgery*, 1999, Vol. 4, no. 1, pp. 88-96. (In Russ.)]
6. Киселевский М.В., Громова Е.Г., Фомин А.М. Сепсис: этиология, патогенез, экстракорпоральная детоксикация. М.: Особая книга, 2021. 176 с. [Kiselevsky M., Gromova E., Fomin A. Sepsis: etiology, pathogenesis, extracorporeal detoxification]. Moscow: Osobaya kniga, 2021. 176 p.
7. Кологривова Е.Н., Плешко Р.И., Щербик Н.В., Староха А.В., Чичинскас Э. Влияние интраназального применения Имунофана на активность фагоцитов при комплексной терапии экссудативного среднего отита у детей // Медицинская иммунология, 2020. Т. 22, № 4. С. 741-750. [Kologrivova E.N., Pleshko R.I., Scherbik N.V., Starokha A.V., Chichinskass E. Effects of intranasal Immunofan administration upon phagocytic activity in treatment of exudative otitis media in children. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2020, Vol. 2, no. 4, pp. 741-750. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-EOI-1720.
8. Нестерова И.В., Ковалева С.В., Чудилова Г.А., Малиновская В.В. Интерферо- и иммунотерапия в реабилитации иммунокомпрометированных детей с возвратными респираторными инфекциями. В кн.: Иммунотерапия в практике ЛОР-врача и терапевта. А.С. Симбирцев, Г.В. Лавренова, ред. СПб.: Диалог, 2018. С. 167-189. [Nesterova I.V., Kovaleva S.V., Chudilova G., Malinovskaya V.V. Interferon and immunotherapy in the rehabilitation of immunocompromised children with recurrent respiratory infections. In: *Immunotherapy in the practice of an ENT doctor and therapist*. Edit. A.S. Simbirtsev, G.V. Lavrenova]. St. Petersburg: Dialog, 2018, pp. 167-189.
9. Нестерова И.В., Колесникова Н.В., Чудилова Г.А., Ломтатидзе Л.В., Ковалева С.В., Евглевский А.А., Нгуен Т.Л. Новый взгляд на нейтрофильные гранулоциты: переосмысление старых догм. Часть 2 // Инфекция и иммунитет, 2018. Т. 8, № 1. С. 7-18. [Nesterova I.V., Kolesnikova N.V., Chudilova G.A., Lomtatidze L.V., Kovaleva S.V., Evglevsky A.A., Nguyen T.L. The new look at neutrophilic granulocytes: Rethinking old dogmas. Part 2. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2018, Vol. 8, no. 1, pp. 7-18. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-2018-1-7-18.
10. Нестерова И.В., Чудилова Г.А., Ковалева С.В., Ломтатидзе Л.В., Колесникова Н.В., Евглевский А.А. Методы комплексной оценки функциональной активности нейтрофильных гранулоцитов в норме и патологии. Методические рекомендации. Краснодар, 2017. 52 с. [Nesterova I.V., Chudilova G.A., Kovaleva S.V., Lomtatidze L.V., Kolesnikova N.V., Yevlevsky A.A. Methods for comprehensive assessment of the functional activity of neutrophil granulocytes in health and disease (guidelines)]. Krasnodar, 2017. 52 p.
11. Окунев Н.А., Окунева А.И., Солдатов О.М., Буданова М.А. Перитонит или дебют сахарного диабета // Детская хирургия, 2018. Т. 22, № 3. С. 127-129. [Okunev N.A., Okuneva A.I., Soldatov O.M., Budanova M.A. Peritonite or debut of diabetes mellitus. *Detskaya khirurgiya = Russian Journal of Pediatric Surgery*, 2018, Vol. 22, no. 3, pp. 127-129. (In Russ.)]
12. Примбеков С.Ш. Опыт лечения хирургической инфекции с использованием полиоксидония // Медицина и экология, 2012. № 2 (63). С. 10-15. [Primbekov S.Sh. Experience of treatment of the surgical infection with use of Polyoxidonium. *Meditsina i ekologiya = Medicine and Ecology*, 2012, no. 2 (63), pp. 10-15. (In Russ.)]
13. Савченко А.А., Борисов А.Г., Кудрявцев И.В., Гвоздев И.И., Мошев А.В., Черданцев Д.В., Первова О.В. Взаимосвязь фенотипа и метаболизма нейтрофилов крови у больных распространенным гнойным перитонитом в динамике послеоперационного периода // Инфекция и иммунитет, 2017. Т. 7, № 3. С. 259-270. [Savchenko A.A., Borisov A.G., Kudryavcev I.V., Gvozdev I.I., Moshev A.V., Cherdancev D.V., Pervova O.V. The phenotype and metabolism relationship of blood neutrophils in patients with widespread purulent peritonitis in the postoperative period dynamics. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2017, Vol. 7, no. 3, pp. 259-270. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-2017-3-259-270.
14. Савченко А.А., Зdziтовецкий Д.Э., Борисов А.Г. Иммунометаболические нарушения при распространенном гнойном перитоните. Новосибирск: Наука, 2013. 142 с. [Savchenko A.A., Zdzitovetsky D.E., Borisov A.G. Immunometabolic disorders in advanced purulent peritonitis]. Novosibirsk: Nauka, 2013. 142 p.
15. Чудилова Г.А., Нестерова И.В., Павленко В.Н., Тетерин Ю.В., Барова Н.К., Тараканов В.А. Вариации фенотипа субпопуляций CD64⁺CD16⁺CD32⁺CD11b⁺ нейтрофильных гранулоцитов, ассоциированные с нарушениями фагоцитарной и микробицидной активности при различных формах перитонита у детей // Аллергология и иммунология, 2021. Т. 22, № 1. С. 28-35. [Chudilova G.A., Nesterova I.V., Pavlenko V.N., Barova N.K., Tarakanov V.A. Variations in the phenotype of subpopulations CD64⁺CD16⁺CD32⁺CD11b⁺ and CD64⁺CD16⁺CD32⁺CD11b⁺ neutrophilic granulocytes associated with disorders of phagocytic and microbicidal

activity at various forms of peritonitis in children. *Allergologiya i immunologiya = Allergology and Immunology*, 2021, Vol. 22, no. 1, pp. 28-35. (In Russ.)]

16. Akhmedov I.Yu., Rafikov B.R., Azizov Sh.F., Dalerov A.D. Early diagnostics of postoperative purulus complications with disseminated appendicular peritonitis in children // Вопросы науки и образования, 2019. T. 2, № 45. С. 129-133. [Akhmedov I.Yu., Rafikov B.R., Azizov Sh.F., Dalerov A.D. Early diagnostics of postoperative purulus complications with disseminated appendicular peritonitis in children. *Voprosy nauki i obrazovaniya = Issues of Science and Education*, 2019, Vol. 2 (45), pp. 129-133. (In Russ.)]

17. Bobrysheva I.V. Immunomodulator Imunofan affects cell profile of morphofunctional zones of rat thymus and delays its age-related involution. *Bulletin of Russian State Medical University*, 2016, no. 3, pp. 34-38.

18. Bournazos S., Wang T.T., Ravetch J.V. The role and function of Fcγ receptors on myeloid cells. *Microbiol. Spectr.*, 2016, Vol. 4, no. 6, 10.1128/microbiolspec.MCHD-0045-2016. doi: 10.1128/microbiolspec.MCHD-0045-2016.

19. Coxon A., Cullere X., Knight S., Sethi S., Wakelin M.W., Stavrakis G., Luscinskas F.W., Mayadas T.N. Fcγ3 mediates neutrophil recruitment to immune complexes. A mechanism for neutrophil accumulation in immune-mediated inflammation. *Immunity*, 2001, Vol. 14, no. 6, pp. 693-704.

20. El-Benna J., Dang P.M.-C., Gougerot-Pocidalo M.-A. Priming of the neutrophil NADPH oxidase activation: role of p47phox phosphorylation and NOX2 mobilization to the plasma membrane. *Semin. Immunopathol.*, 2008, Vol. 30, pp. 279-289.

21. Koval L.M., Zverkova A.S., Grailhe R., Utkin Y.N., Tsetlin V.I., Komisarenko S.V., Skok M.V. Nicotinic acetylcholine receptors α4β2 and α7 regulate myelo- and erythropoiesis within the bone marrow. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 2008, Vol. 40, no. 5, pp. 980-990.

22. Liu Z., Zheng X., Wang J., Wang E. Molecular analysis of thymopentin binding to HLA-DR molecules. *PLoS One*, 2007, Vol. 2, no. 12, e1348. doi: 10.1371/journal.pone.0001348.

23. Malech H.L., de Leo F.R., Quinn M.T. The Role of Neutrophils in the immune system: An overview. *Methods Mol. Biol.*, 2020, Vol. 2087, pp. 3-10.

24. Mortaz E., Alipoor S.D., Adcock I.M., Mumby S., Koenderman L. Update on neutrophil function in severe inflammation. *Front. Immunol.*, 2018, Vol. 9, 2171. doi: 10.3389/fimmu.2018.02171.

25. Mulcahy M.J., Lester H.A. Granulocytes as models for human protein marker identification following nicotine exposure. *J. Neurochem.*, 2017, Vol. 142, no. 2, pp. 151-161.

26. Nesterova I.V., Chudilova G.A., Pavlenko V.N., Tarakanov V.A. *In vitro* experimental rewiring of 4 neutrophilic granulocyte subsets from the pro-inflammatory to the anti-inflammatory phenotype in children with surgical purulent infection of soft tissue. *Medical Immunology (Russia)*, 2021, Vol. 23, no. 4, pp. 819-824. doi: 10.15789/1563-0625-IVE-2311.

27. Nimmerjahn F., Ravetch J.V. Fcγ receptors as regulators of immune responses. *Nat. Rev. Immunol.*, 2008, Vol. 8, no. 1, pp. 34-47.

28. Rollet-Labelle E., Gilbert C., Naccache P.H. Modulation of human neutrophil responses to CD32 cross-linking by serine/threonine phosphatase inhibitors: cross-talk between serine/threonine and tyrosine phosphorylation. *J. Immunol.*, 2000, Vol. 164, no. 2, pp. 1020-1028.

29. Serov D., Tikhonova I., Safronova V., Astashev M. Calcium activity in response to nAChR ligands in murine bone marrow granulocytes with different Gr-1 expression. *Cell Biol. Int.*, 2021, Vol. 45, no. 7, pp. 1533-1545.

30. Silvestre-Roig C., Fridlender Z.G., Glogauer M., Scapini P. Neutrophil diversity in health and disease. *Trends Immunol.*, 2019, Vol. 40, no. 7, pp. 565-583.

31. van Spruiel A.B., Leusen J.H., van Egmond M., Dijkman H.B., Assmann K.J., Mayadas T.N., van de Winkel J.G. Mac-1 (CD11b/CD18) is essential for Fcγ receptor-mediated neutrophil cytotoxicity and immunologic synapse formation. *Blood*, 2001, Vol. 97, no. 8, pp. 2478-2486.

32. Venkatasubramanian K., Audhya T., Goldstein G. Binding of thymopoietin to the acetylcholine receptor. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 1986, Vol. 83, no. 10, pp. 3171-3174.

33. Wang Y., Jönsson F. Expression, role, and regulation of neutrophil Fcγ receptors. *Front. Immunol.*, 2019, Vol. 10, 1958. doi: 10.3389/fimmu.2019.01958.

Авторы:

Нестерова И.В. — д.м.н., профессор, главный научный сотрудник отдела клинической и экспериментальной иммунологии и молекулярной биологии центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Краснодар; профессор кафедры аллергологии и иммунологии факультета непрерывного медицинского образования Медицинского института ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», Москва, Россия

Authors:

Nesterova I.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Chief Research Associate, Department of Clinical and Experimental Immunology, and Molecular Biology, Central Research Laboratory, Kuban State Medical University, Krasnodar; Professor, Department of Allergology and Immunology, Faculty of Postgraduate Medical Education, Medical Institute, Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russian Federation

Чудилова Г.А. — д.б.н., доцент, заведующая отделом клинической и экспериментальной иммунологии и молекулярной биологии центральной научно-исследовательской лаборатории, доцент кафедры клинической иммунологии, аллергологии и лабораторной диагностики ФПК и ППС ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Краснодар, Россия

Чанурина В.Н. — аспирант кафедры клинической иммунологии, аллергологии и лабораторной диагностики ФПК и ППС ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Краснодар, Россия

Ковалева С.В. — к.м.н., старший научный сотрудник отдела клинической и экспериментальной иммунологии и молекулярной биологии центральной научно-исследовательской лаборатории, доцент кафедры клинической иммунологии, аллергологии и лабораторной диагностики ФПК и ППС ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Краснодар, Россия

Тетерин Ю.В. — аспирант кафедры клинической иммунологии, аллергологии и лабораторной диагностики ФПК и ППС ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Краснодар, Россия

Барова Н.К. — к.м.н., доцент кафедры хирургических болезней детского возраста ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ; заведующая хирургическим отделением № 1 ГБУЗ «Детская краевая клиническая больница» Министерства здравоохранения Краснодарского края, г. Краснодар, Россия

Лягуша Д.Э. — врач-педиатр хирургического отделения № 1 ГБУЗ «Детская краевая клиническая больница» Министерства здравоохранения Краснодарского края, г. Краснодар, Россия

Тараканов В.А. — д.м.н., профессор, заведующий кафедрой хирургических болезней детского возраста ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Краснодар, Россия

Chudilova G.A., PhD, MD (Biology), Associate Professor, Department of Clinical and Experimental Immunology, and Molecular Biology, Central Research Laboratory, Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation

Chapurina V.N., Postgraduate Student, Department of Clinical and Experimental Immunology, and Molecular Biology, Central Research Laboratory, Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation

Kovaleva S.V., PhD (Medicine), Senior Research Associate, Department of Clinical and Experimental Immunology, and Molecular Biology, Central Research Laboratory, Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation

Teterin Yu.V., Postgraduate Student, Department of Clinical and Experimental Immunology, and Molecular Biology, Central Research Laboratory, Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation

Barova N.K., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Pediatric Surgery, Kuban State Medical University; Head, Surgical Department No. 1, Pediatric Regional Clinical Hospital, Krasnodar, Russian Federation

Lyagusha D.E., Pediatrician, Surgical Department No. 1, Pediatric Regional Clinical Hospital, Krasnodar, Russian Federation

Tarakanov V.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Pediatric Surgery, Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation

Поступила 20.01.2022
Отправлена на доработку 13.02.2022
Принята к печати 06.03.2022

Received 20.01.2022
Revision received 13.02.2022
Accepted 06.03.2022

ОСОБЕННОСТИ «ПОЛЯРИЗАЦИИ» Т-ХЕЛПЕРОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПРИ ОСТРОМ И ХРОНИЧЕСКОМ САРКОИДОЗЕ

Кудрявцев И.В.^{1,2}, Лазарева Н.М.¹, Баранова О.П.¹,
Серебрякова М.К.², Сесь Т.П.¹, Илькович М.М.¹, Тотолян Арег А.^{1,3}

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

² ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

³ ФБУН «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера», Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Саркоидоз является полисистемным иммуноопосредованным заболеванием неизвестной этиологии, при котором могут отмечаться поражения различных органов и, прежде всего, легкие. Выделяют два клинических варианта дебюта саркоидоза: острое/подострое течения саркоидоза (ОС, или синдром Лефгрена) и хроническую форму течения саркоидоза (ХС, или «не Лефгрен-синдром») с высоким риском развития фиброза легких. Целью данного исследования было изучение субпопуляционного состава «поляризованных» Т-хелперов центральной и эффекторной памяти у больных с острым (n = 19) и хроническим (n = 63) дебютом саркоидоза, контролем служили образцы периферической крови, полученные от 48 условно здоровых добровольцев. С использованием многоцветной проточной цитометрии было показано, что при ХС наблюдается достоверное снижение CD3⁺CD4⁺ лимфоцитов относительно как больных с ОС, так и группы контроля (38,94% (31,33-44,24) против 48,96% (43,34-53,54) и 47,63% (43,82-52,73), при p < 0,001 в обоих случаях). При ХС в циркуляции снижается как относительное, так и абсолютное содержание «наивных» Т-хелперов, а также СМ и ЕМ Т-хелперов при сравнении с контрольными значениями. У больных с ОС отмечено увеличение доли и концентрации в периферической крови ЕМ-клеток, способных к миграции в периферические воспаленные ткани, при сравнении с ХС. При анализе Т-хелперов популяции TEMRA отмечено увеличение как относительного, так и абсолютного содержания клеток данной популяции у больных с ОС относительно контрольных значений, так и пациентов с ХС. Достоверные различия по содержанию Th1- и Th2-клеток были отмечены только у пациентов с ХС (9,64% (7,06-13,65) против 13,80% (11,24-18,03) в контроле при p < 0,001, а также 11,96% (9,86-14,78) против 10,67% (9,13-12,98) в контроле при p = 0,048 соответственно). Достоверных различий по относительному содержанию CXCR5⁺CCR6⁺Th17 и CXCR5⁺ фолликулярным Т-хелперам (Tfh) отмечено не было. Для обеих групп пациентов с саркоидозом было показано снижение доли «не классических» Th17 и DN Th17 на фоне увеличения уровня DP Th17-клеток в рамках общего пула CXCR5⁺CCR6⁺ СМ Th, тогда как «классические» Th17 у пациентов с хроническим дебютом заболевания повышались. Сходная динамика изменения баланса между отдельными субпопуляциями Th17 была отмечена при исследовании CCR6-

Адрес для переписки:

Кудрявцев Игорь Владимирович
ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»
197376, Россия, Санкт-Петербург,
ул. Акад. Павлова, 12.
Тел.: 8 (812) 234-16-69.
E-mail: igorek1981@yandex.ru

Address for correspondence:

Kudryavtsev Igor V.
Institute of Experimental Medicine
197376, Russian Federation, St. Petersburg,
Acad. Pavlov str., 12.
Phone: 7 (812) 234-16-69.
E-mail: igorek1981@yandex.ru

Образец цитирования:

И.В. Кудрявцев, Н.М. Лазарева, О.П. Баранова,
М.К. Серебрякова, Т.П. Сесь, М.М. Илькович,
Арег А. Тотолян «Особенности «поляризации»
Т-хелперов периферической крови при остром
и хроническом саркоидозе» // Медицинская
иммунология, 2022. Т. 24, № 3. С. 573-586.
doi: 10.15789/1563-0625-PBT-2468

© Кудрявцев И.В. и соавт., 2022

For citation:

I.V. Kudryavtsev, N.M. Lazareva, O.P. Baranova,
M.K. Serebriakova, T.P. Ses', M.M. Ilkovich,
Areg A. Totolian "Peripheral blood T helper cell subsets in
L.fgren's and non-L.fgren's syndrome patients", Medical
Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2022,
Vol. 24, no. 3, pp. 573-586.
doi: 10.15789/1563-0625-PBT-2468

DOI: 10.15789/1563-0625-PBT-2468

позитивных EM Th, способных покидать циркуляцию и мигрировать на периферию. Таким образом, полученные нами результаты подчеркивают важность баланса между различными субпопуляциями Th17-клеток при различных течениях саркоидоза, а также указывают на высокую значимость этих клеток как перспективных мишеней в терапии саркоидоза.

Ключевые слова: саркоидоз, T-хелперы, дифференцировка T-хелперов, T-хелперы 17, Th17.1, проточная цитометрия

PERIPHERAL BLOOD T HELPER CELL SUBSETS IN LOFGREN'S AND NON-LOFGREN'S SYNDROME PATIENTS

Kudryavtsev I.V.^{a, b}, Lazareva N.M.^a, Baranova O.P.^a,
Serebriakova M.K.^b, Ses' T.P.^a, Ilkovich M.M.^a, Totolian Areg A.^{a, c}

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

^b Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

^c St. Petersburg Pasteur Research Institute of Epidemiology and Microbiology, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. Sarcoidosis is a multisystemic granulomatous disorder of unknown cause, characterized by formation of immune granulomas in various organs, mainly in lungs. Currently, two main phenotypes of pulmonary sarcoidosis are described, i.e., Lofgren's syndrome (LS) is an acute form with favorable outcome, and non-Lofgren's syndrome (nLS) is a chronic type of disease with a high risk of pulmonary fibrosis. Our study was aimed to investigate the balance of main "polarized" CD4⁺ central and effector memory T cells from treatment-naïve patients with pulmonary sarcoidosis (LS (n = 19) and nLS (n = 63)) compared to healthy volunteers (HC, n = 48). This marker might be used as immunological markers for predicting severity of this disorder. Multicolor flow cytometry analysis demonstrated that the patients with nLS showed significantly low levels of relative and absolute numbers of CD3⁺CD4⁺ lymphocytes if compared to patients with LS and control group (38.94% (31.33-44.24) versus 48.96% (43.34-53.54) and 47.63% (43.82-52.73), p < 0.001 in both cases). Moreover, patients with nLS had reduced frequencies and absolute numbers of "naïve", CM and EM Th cells if compared with healthy controls. Furthermore, the patients with LS showed increased relative and absolute numbers of peripheral blood EM Th cells, capable for migration to peripheral inflamed tissues, when compared with nLS. Finally, patients with LS had increased frequencies and absolute numbers of effector TEMRA Th cells as compared to HC and nLS. Next, significant differences Th1 and Th2 cells frequencies were shown between the patients with nLS and HC (9.64% (7.06-13.65) versus 13.80% (11.24-18.03) with p < 0.001, and 11.96% (9.86-14.78) versus 10.67% (9.13-12.98) with p = 0.048, respectively). But there were no significant differences in the relative numbers of CXCR5⁺CCR6⁺Th17 and CXCR5⁺ follicular T helper cells (Tfh) between the groups. Finally, both groups of patients with pulmonary sarcoidosis contained low proportions of "non-classical" Th17 and DN Th17 cell, but increased levels of DP Th17 cells within total CXCR5⁺CCR6⁺ CM Th if compared with HC. Nevertheless, patients with nLS had increased frequency of "classical" Th17 in comparison with healthy controls. A very similar imbalance between different Th17 cell subsets was observed within total CXCR5⁺CCR6⁺ effector memory Th, that were able to migrate from the bloodstream to the sites of infection, or tissue injury. Taken together, the data suggest that the proportions of Th17 cell subsets in pulmonary sarcoidosis can be evaluated as a diagnostic and/or prognostic marker in clinical practice and these cells could serve as a new therapeutic target.

Keywords: sarcoidosis, CD4⁺ T cells, Th cell differentiation, Th17 cell subsets, Th17.1, flow cytometry

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ № 22-24-20013.

Введение

Саркоидоз является полисистемным иммуноопосредованным заболеванием неизвестной этиологии [1, 41]. При саркоидозе могут отмечаться поражения кожи, глаз, центральной нервной системы, сердца и других органов, однако более чем в 90% случаев поражаются легкие [24,

36]. Диагноз «саркоидоз» устанавливают на основании комплексного анализа особенностей клинического течения заболевания, рентгенологических исследований пораженных тканей, тогда как гистологическая верификация диагноза производится при обнаружении эпителиоидно-клеточных неказеифицирующих гранул в биоптатах пораженных тканей [1, 33]. Причем в настоящее время различают два основных клинических варианта дебюта саркоидоза. Вариант

острого/подострого течения саркоидоза — синдром Лефгрена — проявляется внутригрудной лимфаденопатией, узловатой эритемой, суставным синдромом и лихорадкой. Острое же начало саркоидоза характеризуется более благоприятным прогнозом. По данным разных авторов, частота спонтанной ремиссии при синдроме Лефгрена отмечается в 30–85% случаев в первые два года от начала заболевания. При остром/подостром течении саркоидоза описан также более редко встречающийся в клинической практике синдром Хеерфорда–Вальденстрема, характеризующийся развитием лихорадки, увеита и паротита. Наиболее распространенной в клинической практике является хроническая форма течения саркоидоза, или, как ее еще называют, «не Лефгрена-синдром». При таком течении саркоидоза прогноз менее благоприятный, что связано с высоким риском развития фиброза легких [1, 33].

Иммунологические аспекты патогенеза саркоидоза в последние годы исследуются весьма интенсивно. Результаты этих исследований указывают, что различные субпопуляции Т-хелперов, регулирующие функциональную активность основных эффекторных клеток врожденного и приобретенного иммунитета, играют ведущую роль в развитии данного патологического состояния [7, 17, 41]. В течение длительного времени сохранялась Th1-парадигма иммунопатогенеза саркоидоза и других гранулематозных заболеваний, связанных с активацией IFN γ макрофагов, развитием воспаления и деструктивных процессов в тканях за счет освобождаемых макрофагами провоспалительных цитокинов, протеолитических ферментов и активных форм кислорода. Так, при саркоидозе активированные макрофаги и дендритные клетки секретируют цитокины IL-12 и IL-18, способствующие дифференцировке «наивных» Th0 в Th1 [39]. Поляризованные Th1 в свою очередь усиливают иммунный ответ и секретируют ряд цитокинов, включая IFN γ и IL-2, что связано с активацией транскрипционного фактора T-bet и экспрессией на поверхности Th1 хемокинового рецептора CXCR3 [36]. Причем именно с активностью Th1 связывали интенсивность процесса гранулемообразования, характер клинического течения саркоидоза и его исход.

С открытием Т-хелперов 17 (Th17) парадигма иммунопатогенеза саркоидоза несколько изменилась. Так, в настоящее время многочисленные исследования свидетельствуют о важной роли не только Th1, но и Th17 в развитие данного заболевания [30, 45]. Более того, регулярно появляются новые данные о высокой «гетерогенности» и «пластичности» уже отдельных субпопуляций

Th17 у больных саркоидозом при различных типах клинического течения [14, 15]. Основными клетками-эффекторами при саркоидозе являются субпопуляции Т-лимфоцитов: Т-хелперы 1-го типа (Th1), 17-го типа (Th17), клетки, ответственные за одновременную продукцию интерферона гамма (IFN γ) и интерлейкина-17А (IL-17А) — «не классические» Th17, Th1/Th17 или Th17.1. Ряд авторов отмечают также нарушения в субпопуляционном составе [11, 19], фенотипических характеристиках [21] и функциональной активности регуляторных Т-лимфоцитов (Treg), что может сопровождаться снижением эффективности в регуляции реакций врожденного и приобретенного иммунитета в целом, а также приводить к хронической форме течения саркоидоза и развитию фиброза [8]. Более того, существенные нарушения отмечаются и в регуляции специфического гуморального иммунитета, что выражается не только в изменении состава циркулирующих в крови В-лимфоцитов [4, 27], но изменениями в функциональной активности фолликулярных Т-хелперов, которые контролируют все процессы дифференцировки и активации В-лимфоцитов в пределах лимфоидной ткани [20, 26].

Вместе с тем следует отметить, что Th1/Th17-парадигма патогенеза саркоидоза еще окончательно не сложилась. Многие данные, полученные на клиническом материале, в том числе при исследованиях, выполненных в периферической крови и ЖБАЛ при разных типах течения саркоидоза, нередко бывают противоречивыми. Ряд авторов указывают, что у пациентов с активным саркоидозом повышены уровни основного цитокина, продуцируемого Th17 — IL-17А, практически во всех исследуемых компартментах — в легочной ткани, в лимфатических узлах, в жидкости бронхоальвеолярного лаважа (ЖБАЛ), а также и в периферической крови [14, 43]. Число клеток, продуцирующих одновременно несколько цитокинов — IL-17А/IFN γ , IL-17А/IL-4 — также достоверно повышено ЖБАЛ и в периферической крови больных саркоидозом [43]. При остром течении саркоидоза в ЖБАЛ больных отмечаются более низкие уровни IFN γ (секретируемого в основном Th1), по сравнению с величиной этого показателя у больных с хроническим течением. При этом уровни цитокинов, продуцируемых Th17 (IL-17А, IL-22 и IL-2), напротив, существенно превышали значения при хроническом течении саркоидоза [36].

Комплексное исследование экспрессии поверхностных маркеров Т-лимфоцитов — Т-хелперов при остром и хроническом дебюте заболевания, выполненное до начала назначения больным иммуносупрессивной терапии в настоящем исследовании, несомненно, может спо-

способствовать более полному пониманию иммуноопосредованных механизмов патогенеза при разных вариантах течения саркоидоза. **Целью данной работы** было изучение особенностей субпопуляционного состава Th различного уровня дифференцировки на основании экспрессии ключевых хемокиновых рецепторов в периферической крови больных с острым и хроническим дебютом впервые выявленного саркоидоза.

Материалы и методы

Объектом исследования служила венозная кровь больных с хроническим ($n = 63$) или острым ($n = 19$) дебютом саркоидоза в возрасте 20-65 лет, не получавших иммуносупрессивную терапию, в том числе системные кортикостероиды, и плазмаферез. Все больные саркоидозом проходили обследование на базе клиники НИИ интерстициальных и орфанных заболеваний легких при ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова» Минздрава России. Диагноз саркоидоз для больных с хроническим дебютом был подтвержден с помощью гистологического исследования у 100% больных. Диагноз острый саркоидоз (синдром Леффлера) был поставлен в соответствии с характерными клиническими симптомами. В качестве контроля использовали образцы периферической крови 48 практически здоровых лиц, сопоставимых по полу и возрасту с обследованными больными саркоидозом. Все исследования были проведены с информированного согласия испытуемых и в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» с поправками 2000 г. и «Правилами клинической практики в Российской Федерации», утвержденными Приказом Минздрава РФ от 19.06.2003 г. № 266.

Образцы венозной крови получали собирали в вакуумные пробирки с содержанием K_3EDTA . Все исследования проводились в день взятия крови. Подготовку образцов периферической крови и настройку проточного цитофлуориметра проводили в соответствии с рекомендациями, изложенными Зурочкой и соавторами [2]. Для выявления Т-хелперов периферической крови использовали антитела против CD3 (клон UCST1) и CD4 (клон 13B8.2), Т-хелперы выявляли как $CD3^+CD4^+$ лимфоциты. С целью выявления отдельных популяций Th, находящихся на различных стадиях дифференцировки применяли антитела против поверхностных CD45RA (клон 2H4LDH11LDB9 (2H4)) и CD62L (клон DREG56). «Наивные» Th с фенотипом $CD45RA^+CD62L^+$ для дальнейших исследований не использовали в силу отсут-

ствия экспрессии интересующих хемокиновых рецепторов на их поверхности [3]. «Терминально-дифференцированные» $CD45RA$ -позитивные эффекторные Т-хелперы (TEMRA) с фенотипом $CD45RA^+CD62L^-$ также исключались из дальнейшего анализа ввиду практически полного отсутствия данной популяции клеток в периферической крови условно здоровых доноров. В рамках проведенного исследования основное внимание было уделено Th памяти, которые на основании экспрессии CD62L и CD45RA подразделялись на Т-хелперы центральной (CM Th) и эффекторной (EM Th) памяти с фенотипами $CD45RA-CD62L^+$ и $CD45RA-CD62L^-$ соответственно. На указанных выше субпопуляциях Th, находившихся на разных стадиях дифференцировки, при помощи моноклональных антител анализировали уровень экспрессии следующих хемокиновых рецепторов: CCR4 (CD194, клон L291H4), CCR6 (CD196, клон G034E3), CXCR3 (CD183, клон G025H7) и CXCR5 (CD185, клон J252D4). В работе использовали антитела против CD3, CD4, CD45RA и CD62L, конъюгированные с APC-AlexaFluor750, Pacific Blue, FITC и PE соответственно (Beckman Coulter, США), а антитела против CCR4, CCR6, CXCR3 и CXCR5 были конъюгированы с Brilliant Violet 510™, PE/Cy7, APC и PerCP/Cy5.5 соответственно (Biolegend, США). Удаление эритроцитов из образцов проводили с использованием лизирующего раствора VersaLyse (Beckman Coulter, США), к 975 мкл которого ex tempore добавляли 25 мкл фиксирующего раствора IOtest 3 Fixative Solution (Beckman Coulter, США). После разрушения эритроцитов образцы однократно отмывали избытком физиологического раствора при 330 g в течение 7 минут, после чего надосады удаляли, а клеточный осадок ресуспендировали в физиологическом растворе с pH 7,2-7,4, содержащем 2% параформальдегида (Sigma-Aldrich, США). Анализ образцов проводили на проточном цитофлуориметре Navios™ (Beckman Coulter, США), оснащенном тремя диодными лазерами 405, 488 и 638 нм. Обработку цитофлуориметрических данных проводили при помощи программ Navios Software v. 1.2 и Kaluza™ v. 2.0 (Beckman Coulter, США). Анализ коэкспрессии хемокиновых рецепторов CCR4, CCR6, CXCR3 и CXCR5 проводили с применением тактики «гейтирования», основанной на иерархических дендрограммах для CM и EM клеток памяти, описанной детально ранее [3, 16].

Статистическую обработку проводили при помощи программного обеспечения Statistica 8.0 (StatSoft, США) и GraphPad Prism 4.00 for Windows (GraphPad Prism Software Inc., США). Нормальность распределения проверяли по критерию согласия Пирсона хи-квадрат. Результаты выра-

жали в виде % позитивных клеток от искомой популяции и приводили в виде медианы и интерквартильного размаха (Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})). Сравнение уровней экспрессии основных хемокиновых рецепторов Т-хелперами различных стадий дифференцировки проводили при помощи U-критерия Манна–Уитни.

Результаты

В ходе проведенного исследования было показано, что относительное содержание Т-лим-

фоцитов было достоверно снижено в группе больных с хроническим дебютом саркоидоза при сравнении с группой пациентов с острым дебютом саркоидоза и группой контроля (69,54% (61,15-74,36) против 75,37% (72,33-78,02) и 78,49% (73,81-80,77) при $p = 0,003$ и $p < 0,001$ соответственно). Абсолютное содержание CD3⁺ лимфоцитов между больными с острым и хроническим дебютом заболевания достоверно не различалось ($p = 0,557$) и составляло 982 кл/мкл (712-1259) и 946 кл/мкл (689-1139) соответственно, что

ТАБЛИЦА 1. ОТНОСИТЕЛЬНОЕ И АБСОЛЮТНОЕ СОДЕРЖАНИЕ ПОПУЛЯЦИЙ Т-ХЕЛПЕРОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ, РАЗЛИЧАЮЩИХСЯ ПО ЭКСПРЕССИИ CD45RA И CD62L, У БОЛЬНЫХ С ХРОНИЧЕСКИМ И ОСТРЫМ ДЕБЮТОМ САРКОИДОЗА (Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})), РЕЗУЛЬТАТЫ ПРЕДСТАВЛЕНЫ В ВИДЕ ОТНОСИТЕЛЬНОГО (% ОТ ОБЩЕГО ЧИСЛА ЛИМФОЦИТОВ) И АБСОЛЮТНОГО (#, КОЛ-ВО КЛЕТОК В 1 мкл ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ) ЧИСЛА ЛИМФОЦИТОВ

TABLE 1. RELATIVE (% WITH TOTAL LYMPHOCYTES SUBSET, %) AND ABSOLUTE (NUMBER OF CELLS IN 1 μ L OF PERIPHERAL BLOOD, #) OF Th SUBSETS USING CD45RA-vs.-CD62L CLASSIFICATION IN PATIENTS WITH CHRONIC (NON-LOFGREN'S SYNDROMES, nLS, n = 63) AND ACUTE (LOFGREN'S SYNDROMES, LS, n = 19) SARCOIDOSIS VERSUS HEALTHY CONTROL (HC, n = 48). THE QUANTITATIVE DATA ARE REPRESENTED AS MEDIAN AND QUARTILE RANGES, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

Популяция Th Th subset		Хронический nLS	Острый LS	Контроль HC	p
«Наивные» Th (CD45RA⁺CD62L⁺) "Naïve" Th (CD45RA ⁺ CD62L ⁺)	%	11,90 (7,12-17,32)	13,18 (10,41-16,15)	14,56 (12,44-18,51)	$p_{1-2} = 0,222$ $p_{1-3} = 0,006$ $p_{2-3} = 0,204$
	#	159 (77-235)	177 (113-225)	217 (188-325)	$p_{1-2} = 0,342$ $p_{1-3} < 0,001$ $p_{2-3} = 0,005$
Th центральной памяти (CD45RA⁻CD62L⁺) Central memory Th (CD45RA ⁻ CD62L ⁺)	%	14,79 (12,52-18,23)	16,31 (12,90-21,01)	19,20 (16,74-22,98)	$p_{1-2} = 0,121$ $p_{1-3} < 0,001$ $p_{2-3} = 0,066$
	#	208 (143-288)	204 (157-323)	333 (267-469)	$p_{1-2} = 0,571$ $p_{1-3} < 0,001$ $p_{2-3} = 0,001$
Th эффекторной памяти (CD45RA⁻ CD62L⁻) Effector memory Th (CD45RA ⁻ CD62L ⁻)	%	8,13 (6,06-10,45)	12,31 (10,28-15,64)	10,62 (9,00-13,07)	$p_{1-2} < 0,001$ $p_{1-3} < 0,001$ $p_{2-3} = 0,130$
	#	117 (75-171)	157 (115-238)	178 (139-231)	$p_{1-2} = 0,025$ $p_{1-3} < 0,001$ $p_{2-3} = 0,279$
TEMRA Th (CD45RA⁻CD62L⁺)	%	0,53 (0,11-1,36)	1,71 (0,33-6,52)	0,29 (0,12-0,95)	$p_{1-2} = 0,004$ $p_{1-3} = 0,312$ $p_{2-3} < 0,001$
	#	7 (2-22)	25 (5-83)	5 (2-15)	$p_{1-2} = 0,012$ $p_{1-3} = 0,816$ $p_{2-3} = 0,006$

Примечание. p_{1-2} – различия между группами пациентов с острым и хроническим дебютом саркоидоза достоверны; p_{1-3} – различия достоверны между группами пациентов с хроническим дебютом саркоидоза и контролем; p_{2-3} – различия достоверны между группами пациентов с острым дебютом саркоидоза и контролем. Различия достоверны согласно U-критерию Манна–Уитни.

Note. p_{1-2} , the differences between LS and nLS groups; p_{1-3} , the differences between nLS and healthy control groups; p_{2-3} , the differences between LS and healthy control groups. Differences between the groups calculated by nonparametric Mann–Whitney U test are shown.

ТАБЛИЦА 2. ОТНОСИТЕЛЬНОЕ СОДЕРЖАНИЕ ОСНОВНЫХ СУБПОПУЛЯЦИЙ «ПОЛЯРИЗОВАННЫХ» Т-ХЕЛПЕРОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ В РАМКАХ ОБЩЕГО ПУЛА Т-ХЕЛПЕРОВ ЦЕНТРАЛЬНОЙ ПАМЯТИ ПРИ САРКОИДОЗЕ, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 2. RELATIVE NUMBER OF MAIN "POLARIZED" Th SUBSETS IN PERIPHERAL BLOOD FROM PATIENTS WITH CHRONIC (NON-LOFGREN'S SYNDROMES, nLS, n = 63) AND ACUTE (LOFGREN'S SYNDROMES, LS, n = 19) SARCOIDOSIS VERSUS HEALTHY CONTROL (HC, n = 48). THE QUANTITATIVE DATA ARE REPRESENTED AS MEDIAN AND QUARTILE RANGES, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

Популяция Th Th subsets	Хронический nLS	Острый LS	Контроль HC	p
Th1	9,64% (7,06-13,65)	11,25% (8,31-15,25)	13,80% (11,24-18,03)	p ₁₋₂ = 0,229 p ₁₋₃ < 0,001 p ₂₋₃ = 0,053
Th2	11,96% (9,86-14,78)	13,39% (9,52-16,85)	10,67% (9,13-12,98)	p ₁₋₂ = 0,895 p ₁₋₃ = 0,048 p ₂₋₃ = 0,164
Th17	39,50% (32,66-45,88)	38,53% (33,09-41,37)	37,24% (33,46-43,25)	p ₁₋₂ = 0,672 p ₁₋₃ = 0,278 p ₂₋₃ = 0,829
Tfh	18,23% (15,53-23,42)	19,36% (15,52-23,01)	18,16% (16,50-21,63)	p ₁₋₂ = 0,934 p ₁₋₃ = 0,854 p ₂₋₃ = 0,776

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. As for table 1.

было достоверно ($p = 0,001$ и $p < 0,001$ соответственно) ниже значений контрольной группы — 1270 кл/мкл (1090-1580). Более того, при хроническом дебюте саркоидоза нами было отмечено достоверное снижение CD3⁺CD4⁺ лимфоцитов относительно как больных с острым дебютом, так и группы контроля (38,94% (31,33-44,24) против 48,96% (43,34-53,54) и 47,63% (43,82-52,73) соответственно, при $p < 0,001$ в обоих случаях). Концентрация Т-хелперов в периферической крови была снижена при сравнении с контролем в обеих группах больных (775 кл/мкл (671-1053) против 607 кл/мкл (490-743) в случае острого и 505 кл/мкл (372-704) в случае хронического дебютов при $p = 0,003$ и $p < 0,001$ соответственно), тогда как сами пациенты саркоидозом между группами не различались ($p = 0,074$).

Следующим этапом проведенного нами исследования был анализ уровня дифференцировки Т-хелперов периферической крови у больных саркоидозом, результаты которого приведены в таблице 1. Показано, что при хроническом дебюте саркоидоза в циркуляции снижается как относительное, так и абсолютное содержание «наивных» Т-хелперов, а также СМ и ЕМ Т-хелперов при сравнении с контрольными значениями. Тогда как для острого дебюта было характерно сниженное содержание только «наивных» и СМ клеток. Следует также подчеркнуть и тот факт, что у больных с острым дебютом заболевания отмече-

но увеличение доли и концентрации в периферической крови ЕМ клеток, способных к миграции в периферические воспаленные ткани, при сравнении с пациентами, у которых наблюдалась хроническая форма саркоидоза (12,31% (10,28-15,64) против 8,13% (6,06-10,45) при $p < 0,001$, а также 157 кл/мкл (115-238) против 117 кл/мкл (75-171) при $p = 0,025$ соответственно). Более того, при анализе Т-хелперов популяции TEMRA отмечено увеличение как относительного, так и абсолютного содержания клеток данной популяции у больных с острым дебютом относительно контрольных значений ($p < 0,001$ и $p = 0,006$ соответственно), так и пациентов с хроническим дебютом ($p = 0,004$ и $p = 0,012$ соответственно).

В ходе дальнейших исследований особое внимание было уделено Т-хелперам популяций СМ, способным к миграции во вторичные лимфоидные органы, и ЕМ, которые могут покидать кровеносное русло и мигрировать в очаги воспаления в периферических тканях. При анализе субпопуляционного состава СМ Th у больных саркоидозом нами была отмечена тенденция к снижению доли Th1 и увеличение процентного содержания Th2 (табл. 2). Однако достоверные различия по содержанию Th1 и Th2 клеток были отмечены только у пациентов с хроническим дебютом (9,64% (7,06-13,65) против 13,80% (11,24-18,03) в контроле при $p < 0,001$, а также 11,96% (9,86-14,78) против 10,67% (9,13-12,98) в

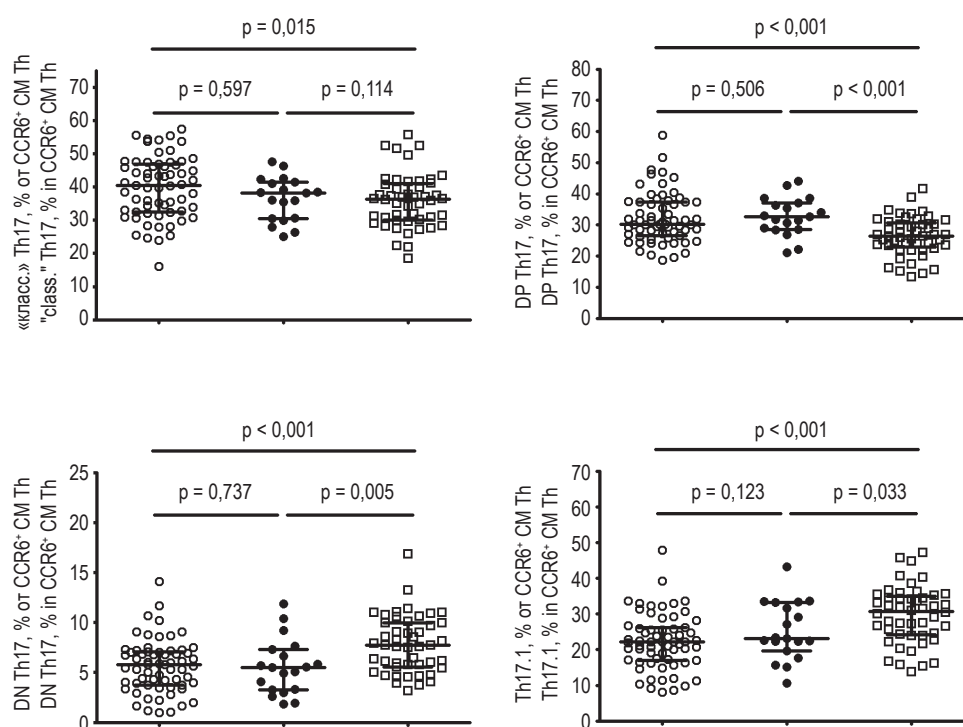


Рисунок 1. Распределение Th17 по основным субпопуляциям клеток в пределах общего пула CCR6⁺Th центральной памяти (CM) с фенотипом CD45RA⁺CD62L⁺

Примечание. Здесь и на рисунке 2: белые круги – больные с хронической формой саркоидоза (n = 63); черные круги – больные с острой формой саркоидоза (n = 19); квадраты – группа условно здоровых доноров (n = 48). Результаты представлены в виде медианы и интерквартильного размаха (Me (Q_{0,25}–Q_{0,75})). Различия между сравниваемыми группами указаны согласно непараметрическому критерию Манна–Уитни. Основные субпопуляции Th17-клеток обладают следующими фенотипами: «классические» Th17 – CCR6⁺CCR4⁺CXCR3⁻; «дважды-позитивные» DP Th17 – CCR6⁺CCR4⁺CXCR3⁺, «не классические» или Th17.1 – CCR6⁺CCR4⁻CXCR3⁺, а также «дважды-негативные» DN Th17 – CCR6⁺CCR4⁻CXCR3⁻.

Figure 1. Relative numbers of main Th17 subsets within total CCR6⁺ central memory Th cells (CD3⁺CD4⁺CD45RA⁺CD62L⁺, CM)

Note. Hereinafter, symbols in Figure 1 and 2 denote the following groups: white circles, patients with chronic sarcoidosis (non-Lofgren's Syndromes, n = 48); black circles, patients with acute sarcoidosis (Lofgren's Syndromes, n = 19); white squares, healthy control group (n = 48). The data are presented as median with interquartile range (Me (Q_{0,25}–Q_{0,75})). Differences between the groups calculated by nonparametric Mann–Whitney U test are shown. Among CCR6⁺T cells, four subsets expressing different patterns of CCR4 and CXCR3 were identified: "classical" Th17 (CCR6⁺CCR4⁺CXCR3⁻), "double positive" DP Th17 (CCR6⁺CCR4⁺CXCR3⁺), "non classical" Th17.1 (CCR6⁺CCR4⁻CXCR3⁺) and "double negative" Th17 (CCR6⁺CCR4⁻CXCR3⁻).

контроле при p = 0,048 соответственно). Достоверных различий по относительному содержанию CXCR5⁺CCR6⁺Th17 и CXCR5⁺ фолликулярным Т-хелперам (Tfh) отмечено не было. Более того, при анализе ключевых субпопуляций «поляризованных» Th в пределах общего пула ЕМ Т-хелперов нами отмечено не было.

Среди CCR6⁺CM и ЕМ Th нами были выделены четыре основные субпопуляции Th17, которые различались как по паттернам экспрессии хемокиновых рецепторов CXCR3 и CCR4, так и по спектру функциональных активностей [34, 44]. В настоящее время выделяют «классические» Th17 с фенотипом CCR4⁺CXCR3⁻, CCR4⁺CXCR3⁺ Th17 обозначаемые как «дважды-позитивные» или DP Th17, затем «не классические» CCR4⁻CXCR3⁺ или

Th17.1 и, наконец, «дважды-негативные» CCR4⁻CXCR3⁻ или DN Th17 лимфоциты. На рисунке 1 приведены результаты сравнения относительно содержания указанных выше популяций CM Th17 у пациентов с хроническим и острым дебютами саркоидоза, а также условно здоровых доноров. У пациентов с хроническим дебютом саркоидоза в рамках общего пула CCR6⁺CM Th отмечено снижение «не классических» Th17 и DN Th17 относительно значений группы контроля (22,15% (16,98–26,11) против 30,65% (24,14–34,93) при p < 0,001 и 5,76% (3,76–7,05) против 7,73% (5,66–10,03) при < 0,001 соответственно). Тогда как уровень CCR4-экспрессирующих типов популяций этих клеток – «классических» и DP Th17 – у пациентов, входивших в группу хрони-

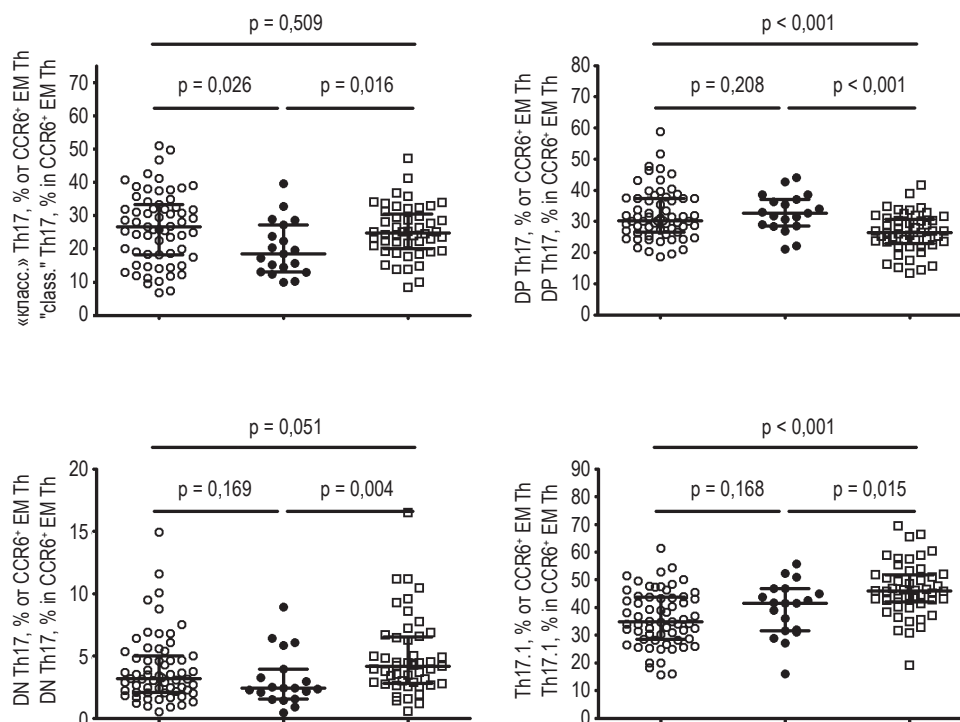


Рисунок 2. Распределение Th17 по основным субпопуляциям клеток в пределах общего пула CCR6⁺Th эффекторной памяти (EM) с фенотипом CD45RA⁺CD62L⁻.

Примечание. См. примечание к рисунку 1.

Figure 2. Relative numbers of main Th17 subsets within total CCR6⁺ effector memory Th cells (CD3⁺CD4⁺CD45RA⁺CD62L⁻; EM)

Note. As for Figure 1.

ческого саркоидоза, был достоверно выше контрольных показателей (40,39% (32,41-46,88) против 36,28% (30,05-40,96) при $p = 0,015$ и 30,29% (26,57-37,43) против 26,40% (22,93-30,60) при $p < 0,001$ соответственно). Для острого дебюта саркоидоза было характерно увеличение при сравнении с условно здоровыми добровольцами доли DP Th17 ($p < 0,001$) на фоне снижения уровней DP и «не классических» Th17 ($p = 0,005$ и $p = 0,033$ соответственно).

Сходная динамика изменения баланса между отдельными субпопуляциями Th17 была отмечена при исследовании CCR6-позитивных EM Th, способных покидать циркуляцию и мигрировать на периферию (рис. 2). Так, для пациентов с хроническим и острым дебютами саркоидоза наблюдалось увеличение доли DP Th17 с 23,72% (19,24-36,90) до 31,83% (24,05-41,00) и 36,12% (27,24-48,01) соответственно (в обоих случаях $p < 0,001$), а также снижения «не классических» Th17 с 45,89% (41,96-51,87) до 34,86% (28,52-43,77) и 41,57% (31,55-46,86) соответственно (при $p < 0,001$ и $p = 0,015$ соответственно). При остром

дебюте заболевания имело место снижение DN Th17 относительно контроля ($p = 0,004$), тогда как уровень «классических» Th17 был достоверно ниже не только при сравнении с контрольными показателями (18,54% (13,08-27,16) против 24,71% (20,11-30,43), $p = 0,004$), но и значений, полученных для пациентов с хроническим саркоидозом (18,54% (13,08-27,16) против 26,67% (18,16-33,33), $p = 0,026$).

Обсуждение

В настоящем исследовании были сопоставлены показатели у больных с разными формами саркоидоза до назначения им терапии и показано, что среди циркулирующих лимфоцитов уровень CD3⁺T-клеток и CD3⁺CD4⁺T-хелперов существенно снижен у больных хронической формой саркоидоза по сравнению с острой формой и группой контроля. Снижение уровня CD3⁺ и CD3⁺CD4⁺ клеток в периферической крови было отмечено при сравнении больных саркоидозом и условно здоровых добровольцев [43]. Вероятно, это может быть связано с более интенсив-

ным процессом перераспределения лимфоцитов из периферической крови в легочную ткань при хроническом течении саркоидоза относительно острого. Полученные данные указывают на более глубокую степень анергии периферического ответа общей популяции Т-лимфоцитов-хелперов при хронической форме заболевания с менее благоприятным течением и прогнозом.

Более того, при хроническом дебюте саркоидоза нами показано достоверное снижение относительного и абсолютного содержания Т-хелперов, находящихся на различных стадиях созревания за исключением клеток популяции TEMRA (табл. 1). Большинство исследований указывают на тот факт, что при саркоидозе наблюдается снижение пула «наивных» Т-хелперов за счет прироста более высоко дифференцированных субпопуляций Th [11, 40], хотя эти данные подтверждаются не всеми работами [43]. При остром дебюте саркоидоза изменения в субпопуляционном составе Th не носят столь выраженный характер, хотя нами было отмечено снижение концентрации «наивных» клеток и клеток центральной памяти. Следует отметить, что в популяции «наивных» Th большинство клеток обладает уникальными Т-клеточными рецепторами, способными к распознаванию широчайшего спектра новых антигенов [32], тогда как их уменьшение в циркуляции может сопровождаться снижением эффективности иммунных реакций при первичном контакте с патогенами. С другой стороны, существенное ускорение ответа на уже «знакомые» клеткам памяти антигены реализуется благодаря высокой степени дифференцировки клеток памяти (вследствие осуществленного ранее распознавания ими антигена и способности к быстрой активации и пролиферации) при существенно более низком пороге антигенной нагрузки по сравнению с «наивными» и эффекторными Т-лимфоцитами [32]. Таким образом, наблюдаемые при саркоидозе нарушения могут сопровождаться анергией Т-клеточного ответа в целом. С другой стороны, благоприятное течение саркоидоза — острый дебют заболевания — было тесно связано с увеличением в периферической крови Th-эффекторной памяти и TEMRA, уровни которых превосходили значения, полученные для хронического дебюта, а в случае TEMRA — еще и значений контроля. Прирост в циркуляции этих клеток может указывать на интенсивные процессы выселения созревших в лимфоидной ткани Th, обладающих выраженными эффекторными свойствами, на периферию, и, по-видимому, тесно связан с завершением иммунного ответа на антигены, вызвавшие активацию всей системы защитных реакций организма. Таким образом, острое начало заболевания, обусловленное кли-

нико-генетическими особенностями ответа организма на антигенную нагрузку, а, возможно, еще и ответом на несколько иной спектр антигенов, протекает с реализацией несколько различающимися характеристиками иммунного ответа (по сравнению с хроническим течением).

Настоящее исследование посвящено анализу различных популяций и субпопуляций Т-лимфоцитов на основании экспрессии ими рецепторов к хемокинам с целью выяснения ряда ключевых механизмов иммунопатогенеза саркоидоза. Анализ экспрессии хемокиновых рецепторов и содержание их лигандов в биологических жидкостях и тканях позволяет сделать достаточно достоверные выводы о процессах перераспределения клеток в процессе развития заболевания и внести существенный вклад в понимание механизмов иммунопатогенеза. Так, проведенный анализ субпопуляционного состава «поляризованных» Т-хелперов показал, что при неблагоприятном хроническом дебюте саркоидоза имеет место изменение баланса между Th1- и Th2-клетками в пределах СМ Th (табл. 2). Следует отметить, что длительное время патогенез саркоидоза было связано с гиперактивацией Th1-клеток [29], несколько позднее в литературе стали обосновывать ключевую роль в развитии данного патологического состояния нарушением соотношения Th1 и Th17 в очагах формирования гранулем [14]. В настоящее время принято также обращать внимание на потенциальное участие Th2 в гранулемообразовании [42]. Данное предположение подтверждается не только результатами собственных исследований, но и клиническими наблюдениями, которые указывают на прирост уровня CCR4⁺CD4⁺ клеток в периферической крови больных саркоидозом, равно как и на увеличение концентрации хемокина лиганда для этого хемокинового рецептора CCL17 как в сыворотке крови больных [23], так и локально в очаге формирования гранулемы [31]. Более того, в классических экспериментальных работах на *in vivo* моделях фиброза легких была показана ключевая роль лигандов CCR4 (в первую очередь, CCL17, но и CCL22) в фиброзировании тканей, когда блокада эффектов CCL17 у мышей приводила к уменьшению очага поражения [6]. Избыточная активация Th2 у пациентов с саркоидозом также подтверждается данными об увеличении в мононуклеарной фракции клеток крови уровня экспрессии мРНК IL-13 — одного из ключевых цитокинов Th2 [18]. Более того, в экспериментах на лабораторных животных [24] и при анализе образцов тканей, полученных от больных саркоидозом [38], было показано, что гиперпродукция цитокинов Th2 сопровождается активацией и дифференцировкой тканевых макрофагов в сто-

рону M2, что способствует развитию и поддержанию очагов хронического воспаления в тканях, формированию гранулем и очагов фиброза.

Помимо баланса между Th1 и Th2 в исследованиях, посвященных патогенезу саркоидоза, особое внимание уделяется роли Th17 и их отдельных субпопуляций. Данные о динамике Th17 в периферической крови весьма противоречивы, так как встречаются работы, указывающие на увеличение уровня CCR6⁺ эффекторных Т-хелперов (CD45RA-CD45R0⁺) у больных по сравнению с группой контроля [35], так и свидетельствующие о том, что, например, уровень IL-17A-продуцирующих клеток в периферической крови больных был существенно ниже значений контроля [43]. Собственные результаты указывают на отсутствие достоверных различий по уровню CCR6-экспрессирующих CM и EM Th-клеток не только между группами с больных с острым или хроническим дебютом саркоидоза, но и с группой сравнения. Вместе с тем большинством исследователей отмечается увеличение в сыворотке крови больных уровня таких цитокинов и хемокинов, как IL-6, IL-17, IL-22, IFN γ и CCL20, синтезируемых Th17 [11]. При этом в жидкости бронхоальвеолярного лаважа (ЖБАЛ) и также в гранулематозной ткани показано не только увеличение уровня этих цитокинов, но еще и клеток, участвующих в их продукции [28]. Более того, в лимфатических узлах, прилежащих к легким, уровень всех CCR6⁺Th, включая «классические» и, в первую очередь, Th17.1-клетки, был существенно повышен по сравнению с контролем [9]. Однако, помимо указанных субпопуляций Th17, в лимфатических узлах больных отмечалось увеличение доли DP Th17. Увеличение именно этой субпопуляции Th17-клеток было показано нами при анализе CM и EM Th периферической крови в рамках проведенного исследования (рис. 1 и 2). Следует отметить, что среди всех субпопуляций Th17 именно DP Th17 отличаются повышенной способностью мигрировать в периферические ткани различной локализации благодаря высокому уровню экспрессии адгезионных молекул и хемокиновых рецепторов, ответственные за проникновение в воспаленные ткани кишечника (β 7-интегрин и CXCR3), дерму кожи (CCR2 и CCR4) и слизистые оболочки мочеполовой системы (β 1-интегрин) [44]. Вместе с тем в условиях *in vitro* в ответ на стимуляцию DP Th17 практически не отвечали секрецией IL-17F, IL-22 и CCL20, а уровни продукции IFN γ , IL-17A, TNF α и IL-13 были самыми низкими при сравнении с остальными типами Th17-клеток. Однако под действием цитокинов IL-1 β , IL-6 и IL-23, необходимых для «поляризации» в сторо-

ну Th17, или IL-12, ответственного за дифференцировку Th0 в сторону Th1, большинство клеток популяции DP Th17, по крайней мере, в условиях *in vitro* приобретало фенотип и свойства «не классических» Th17 [44].

Как уже нами было отмечено выше, именно «не классические» Th17- или Th17.1-клетки, по-видимому, являются основными продуктами IFN γ при формировании гранулем [17, 30]. В ходе собственных исследований нами было отмечено снижение относительного содержания CXCR3⁺CCR6⁺Th17.1-клеток в периферической крови больных обеих групп при сравнении с контролем (рис. 1, 2). Следует отметить, что у больных саркоидозом в ЖБАЛ многими исследователями отмечалось увеличение уровней лигандов для хемокиновых рецепторов CXCR3 (например, CXCL10 [5]) и CCR6 (CCL20 [13]), представленных на поверхности Th17.1. Можно предполагать, что данная популяция клеток может более эффективно, по сравнению с остальными типами Th17, мигрировать по градиенту этих хемокинов и селективно накапливаться в очаге воспаления. Хотя до настоящего времени эти предположения основываются лишь на косвенных данных, связанных с преимущественным обнаружением в очагах гранулемообразования и ЖБАЛ клеток именно Th17.1-фенотипа [9, 35].

Детальный анализ субпопуляционного состава Th17 позволил обнаружить, что больные с острым и хроническим дебютами саркоидоза различаются по уровню «классических» CCR4⁺CXCR3⁺Th17 в рамках общего пула Th эффекторной памяти (рис. 2). «Классические» Th17 могут быть представлены двумя основными фенотипами клеток, несущими на своей поверхностной мембране только CCR6 или же коэкспрессирующие CCR6 и CCR4 [37]. Эти клетки способны к синтезу большого количества IL-17A в ответ на стимуляцию, тогда как продукция остальных цитокинов, в первую очередь IL-22 и GM-CSF, у них менее выражена. Отдельного внимания заслуживает популяция клеток с фенотипом CXCR5⁺CXCR3⁺CCR6⁺CCR4⁺, в рамках которой, помимо «классических» Th17, присутствуют еще и Th22. Основными лигандами для CCR4 являются хемокины CCL17 или TARC (от англ. thymus and activation-regulated chemokine) и CCL22 или MDC (от англ. macrophage-derived chemokine), уровни которых были повышены в периферической крови больных саркоидозом [23]. Для Th22 характерна не только экспрессия CCR6 и CCR4 на поверхностной мембране, но и наличие CCR10, отвечающего за направленную миграцию клеток в дерму кожи [12]. Th22 продуцируют такие цитокины, как IL-22, IL-26 и IL-13, причем именно

IL-22 является наиболее важным с точки зрения реализации функций этих клеток в очаге воспаления [22]. С использованием нескольких независимых *in vivo* моделей фиброза легких у экспериментальных животных было показано, что нейтрализация IL-22 сопровождалась увеличением инфильтрации ткани легкого нейтрофилами периферической крови и увеличением очага поражения [10], а также вызывала усиление отложения коллагена в тканях воспаленного легкого [40]. Полученные нами результаты, указывающие на снижение в крови Th22, ответственных за продукцию IL-22, у пациентов с благоприятным прогнозом течения саркоидоза, также косвенно указывают на важность этого цитокина и клеток, способных к его синтезу и секреции, в процессах гранулемообразования.

Вместе с тем следует подчеркнуть, что основные данные о функциях и «пластичности» Th17, Th17.1 и Th22 получены в условиях *in vitro* при создании различного цитокинового микроокружения, влияющего на дифференцировку лимфоцитов. При анализе механизмов развития

саркоидоза и формирования гранулем остаются неразрешенными некоторые ключевые вопросы, к числу которых относятся: каким образом феномен пластичности Th17 коррелирует с типами течения саркоидоза и его прогнозом; каковы закономерности превращения одних популяций клеток в популяции с совершенно иными свойствами; какова роль разных субпопуляций в очаге воспаления и в чем заключается их влияние на клиническое течение заболевания; и, наконец, какие новые точки приложения могут быть намечены для планирования успешной таргетной терапии. Для более полной характеристики патологических процессов и ролей разных субпопуляций Т-лимфоцитов в иммунопатогенезе саркоидоза необходимы дальнейшие клинико-иммунологические сопоставления данных, полученных в динамике при сравнительном анализе исследуемых параметров в периферической крови, ЖБАЛ и материалах биопсии легочной ткани, что позволит выполнить интегральную оценку процессов, протекающих на уровне всего организма.

Список литературы / References

1. Визель А.А., Визель И.Ю., Амиров Н.Б. Эпидемиология саркоидоза в Российской Федерации // Вестник современной клинической медицины, 2017. Т. 10, № 5. С. 66-73. [Vizel A.A., Vizel I.Yu., Amirov N.B. Epidemiology of sarcoidosis in the Russian Federation. *Vestnik sovremennoy klinicheskoy meditsiny = Bulletin of Contemporary Clinical Medicine*, 2017, Vol. 10, no. 5, pp. 66-73. (In Russ.)]
2. Зурочка А.В., Хайдуков С.В., Кудрявцев И.В., Черешнев В.А. Проточная цитометрия в биомедицинских исследованиях. Екатеринбург: Уральское отделение РАН, 2018. 720 с. [Zurochka A.V., Khaidukov S.V., Kudryavtsev I.V., Chereshev V.A. Flow cytometry in biomedical research]. Ekaterinburg: Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, 2018. 720 p.
3. Кудрявцев И.В., Борисов А.Г., Кробинец И.И., Савченко А.А., Серебрякова М.К., Тотолян А.А. Хемокиновые рецепторы на Т-хелперах различного уровня дифференцировки: основные субпопуляции // Медицинская иммунология, 2016. Т. 18, № 3. С. 239-250. [Kudryavtsev I.V., Borisov A.G., Krobintets I.I., Savchenko A.A., Serebriakova M.K., Totolian A.A. Chemokine receptors at distinct differentiation stages of T-helpers from peripheral blood. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2016, Vol. 18, no. 3, pp. 239-250. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2016-3-239-250.
4. Лазарева Н.М., Кудрявцев И.В., Баранова О.П., Серебрякова М.К., Бажанов А.А., Сесь Т.П., Илькович М.М., Тотолян А.А. Анализ субпопуляций В-лимфоцитов в периферической крови больных саркоидозом при разной степени активности заболевания // Медицинская иммунология, 2019. Т. 21, № 6. С. 1081-1098. [Lazareva N.M., Kudryavtsev I.V., Baranova O.P., Serebriakova M.K., Bazhanov A.A., Ses' T.P., Ilkovich M.M., Totolian A.A. Peripheral blood B cell subsets from patients with various activity of chronic sarcoidosis. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2019, Vol. 21, no. 6, pp. 1081-1098. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2019-6-1081-1098.
5. Agostini C., Cassatella M., Zambello R., Trentin L., Gasperini S., Perin A., Piazza F., Siviero M., Facco M., Dziejman M., Chilosio M., Qin S., Luster A.D., Semenzato G. Involvement of the IP-10 chemokine in sarcoid granulomatous reactions. *J. Immunol.*, 1998, Vol. 161, no. 11, pp. 6413-6420.
6. Belperio J.A., Dy M., Murray L., Burdick M.D., Xue Y.Y., Strieter R.M., Keane M.P. The role of the Th2 CC chemokine ligand CCL17 in pulmonary fibrosis. *J. Immunol.*, 2004, Vol. 173, no. 7, pp. 4692-4698.
7. Bennett D., Bargagli E., Refini R.M., Rottoli P. New concepts in the pathogenesis of sarcoidosis. *Expert Rev. Respir. Med.*, 2019, Vol. 13, no. 10, pp. 981-991.
8. Broos C.E., Hendriks R.W., Kool M. T-cell immunology in sarcoidosis: Disruption of a delicate balance between helper and regulatory T-cells. *Curr. Opin. Pulm. Med.*, 2016, Vol. 22, no. 5, pp. 476-483.
9. Broos C.E., Koth L.L., van Nimwegen M., In 'tVeen J.C.C.M., Paulissen S.M.J., van Hamburg J.P., Annema J.T., Heller-Baan R., Kleinjan A., Hoogsteden H.C., Wijsenbeek M.S., Hendriks R.W., van den Blink B., Kool M. Increased T-helper 17.1 cells in sarcoidosis mediastinal lymph nodes. *Eur Respir J.*, 2018, Vol. 51, no. 3, 1701124. doi: 10.1183/13993003.01124-2017.

10. Broquet A., Jacqueline C., Davieau M., Besbes A., Roquilly A., Martin J., Caillon J., Dumoutier L., Renaud J.C., Heslan M., Josien R., Asehnoune K. Interleukin-22 level is negatively correlated with neutrophil recruitment in the lungs in a *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia model. *Sci. Rep.*, 2017, Vol. 7, no. 1, 11010. doi: 10.1038/s41598-017-11518-0.
11. Ding J., Dai J., Cai H., Gao Q., Wen Y. Extensively disturbance of regulatory T cells – Th17 cells balance in stage II pulmonary sarcoidosis. *Int. J. Med. Sci.*, 2017, Vol. 14, no. 11, pp. 1136-1142.
12. Duhon T., Geiger R., Jarrossay D., Lanzavecchia A., Sallusto F. Production of interleukin 22 but not interleukin 17 by a subset of human skin-homing memory T cells. *Nat. Immunol.*, 2009, Vol. 10, no. 8, pp. 857-863.
13. Facco M., Baesso I., Miorin M., Bortoli M., Cabrelle A., Boscaro E., Gurrieri C., Trentin L., Zambello R., Calabrese F., Cassatella M.A., Semenzato G., Agostini C. Expression and role of CCR6/CCL20 chemokine axis in pulmonary sarcoidosis. *J. Leukoc. Biol.*, 2007, Vol. 82, no. 4, pp. 946-955.
14. Facco M., Cabrelle A., Teramo A., Olivieri V., Gnoato M., Teolato S., Ave E., Gattazzo C., Fadini G.P., Calabrese F., Semenzato G., Agostini C. Sarcoidosis is a Th1/Th17 multisystem disorder. *Thorax*, 2011, Vol. 66, no. 2, pp. 144-150.
15. Georas S.N., Chapman T.J., Crouser E.D. Sarcoidosis and T-helper cells. Th1, Th17, or Th17.1? *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2016, Vol. 193, no. 11, pp. 1198-1200.
16. Golovkin A., Kalinina O., Bezrukikh V., Aquino A., Zaikova E., Karonova T., Melnik O., Vasilieva E., Kudryavtsev I. Imbalanced immune response of T-Cell and B-Cell subsets in patients with moderate and severe COVID-19. *Viruses*, 2021, Vol. 13, no. 10, 1966. doi: 10.3390/v13101966.
17. Greaves S.A., Atif S.M., Fontenot A.P. Adaptive immunity in pulmonary sarcoidosis and chronic beryllium disease. *Front. Immunol.*, 2020, Vol. 11, 474. doi: 10.3389/fimmu.2020.00474.
18. Hauber H.P., Gholami D., Meyer A., Pforte A. Increased interleukin-13 expression in patients with sarcoidosis. *Thorax*, 2003, Vol. 58, no. 6, pp. 519-524.
19. 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.
20. Kudryavtsev I., Serebriakova M., Starshinova A., Zinchenko Y., Basantsova N., Malkova A., Soprun L., Churilov L.P., Toubi E., Yablonskiy P., Shoenfeld Y. Imbalance in B cell and T follicular helper cell subsets in pulmonary sarcoidosis. *Sci Rep.*, 2020, Vol. 10, no. 1, 1059. doi: 10.1038/s41598-020-57741-0.
21. Kudryavtsev I.V., Lazareva N.M., Baranova O.P., Golovkin A.S., Isakov D.V., Serebriakova M.K., Ses' T.P., Ilkovich M.M., Totolian A.A. CD39⁺ expression by regulatory T cells in pulmonary sarcoidosis and Löfgren's syndrome. *Medical Immunology (Russia)*, 2019, Vol. 21, no. 3, pp. 467-478. doi: 10.15789/1563-0625-2019-3-467-478.
22. Kumar P., Rajasekaran K., Palmer J.M., Thakar M.S., Malarkannan S. IL-22: An evolutionary missing-link authenticating the role of the immune system in tissue regeneration. *J. Cancer*, 2013, Vol. 4, no. 1, pp. 57-65.
23. Lazareva N.M., Baranova O.P., Kudryavtsev I.V., Isakov D.V., Arsentieva N.A., Liubimova N.E., Ses' T.P., Ilkovich M.M., Totolian A.A. chemokines CCL17 and CCL22 in sarcoidosis. *Medical Immunology (Russia)*, 2021, Vol. 23, no. 4, pp. 791-798. doi: 10.15789/1563-0625-CC4-2340.
24. Locke L.W., Crouser E.D., White P., Julian M.W., Caceres E.G., Papp A.C., Le V.T., Sadee W., Schlesinger L.S. IL-13-regulated macrophage polarization during granuloma formation in an *in vitro* human sarcoidosis model. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 2019, Vol. 60, no. 1, pp. 84-95.
25. Loke W.S., Herbert C., Thomas P.S. Sarcoidosis: immunopathogenesis and immunological markers. *Int. J. Chronic Dis.*, 2013, Vol. 2013, 928601. doi: 10.1155/2013/928601.
26. Ly N.T.M., Ueda-Hayakawa I., Nguyen C.T.H., Okamoto H. Exploring the imbalance of circulating follicular helper CD4⁺ T cells in sarcoidosis patients. *J. Dermatol. Sci.*, 2020, Vol. 97, no. 3, pp. 216-224.
27. Malkova A., Starshinova A., Zinchenko Y., Gavrilova N., Kudryavtsev I., Lapin S., Mazing A., Surkova E., Pavlova M., Belaeva E., Stepanenko T., Yablonskiy P., Shoenfeld Y. New laboratory criteria of the autoimmune inflammation in pulmonary sarcoidosis and tuberculosis. *Clin. Immunol.*, 2021, Vol. 227, 108724. doi: 10.1016/j.clim.2021.108724.
28. Miedema J.R., Kaiser Y., Broos C.E., Wijsenbeek M.S., Grunewald J., Kool M. Th17-lineage cells in pulmonary sarcoidosis and Löfgren's syndrome: Friend or foe? *J. Autoimmun.*, 2018, Vol. 87, pp. 82-96.
29. Moller D.R. Cells and cytokines involved in the pathogenesis of sarcoidosis. *Sarcoidosis Vasc. Diffuse Lung Dis.*, 1999, Vol. 16, no. 1, pp. 24-31.
30. Mortaz E., Rezayat F., Amani D., Kiani A., Garssen J., Adcock I.M., Velayati A. The Roles of T Helper 1, T Helper 17 and regulatory T Cells in the pathogenesis of sarcoidosis. *Iran J. Allergy Asthma Immunol.*, 2016, Vol. 15, no. 4, pp. 334-339.
31. Nguyen C.T.H., Kambe N., Ueda-Hayakawa I., Kishimoto I., Ly N.T.M., Mizuno K., Okamoto H. TARC expression in the circulation and cutaneous granulomas correlates with disease severity and indicates Th2-mediated progression in patients with sarcoidosis. *Allergol. Int.*, 2018, Vol. 67, no. 4, pp. 487-495.
32. Nguyen Q.P., Deng T.Z., Witherden D.A., Goldrath A.W. Origins of CD4⁺ circulating and tissue-resident memory T-cells. *Immunology*, 2019, Vol. 157, no. 1, pp. 3-12.
33. Palchevskiy V., Hashemi N., Weigt S.S., Xue Y.Y., Derhovanessian A., Keane M.P., Strieter R.M., Fishbein M.C., Deng J.C., Lynch J.P., Elashoff R., Belperio J.A. Immune response CC chemokines CCL2 and CCL5 are associated with pulmonary sarcoidosis. *Fibrogenesis Tissue Repair*, 2011, Vol. 4, 10. doi: 10.1186/1755-1536-4-10.

34. Paulissen S.M., van Hamburg J.P., Dankers W., Lubberts E. The role and modulation of CCR6⁺ Th17 cell populations in rheumatoid arthritis. *Cytokine*, 2015, Vol. 74, no. 1, pp. 43-53.
35. Ramstein J., Broos C.E., Simpson L.J., Ansel K.M., Sun S.A., Ho M.E., Woodruff P.G., Bhakta N.R., Christian L., Nguyen C.P., Antalek B.J., Benn B.S., Hendriks R.W., van den Blink B., Kool M., Koth L.L. IFN- γ -producing T-Helper 17.1 Cells are increased in sarcoidosis and are more prevalent than T-Helper type 1 Cells. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2016, Vol. 193, no. 11, pp. 1281-1291.
36. Sakthivel P., Bruder D. Mechanism of granuloma formation in sarcoidosis. *Curr. Opin. Hematol.*, 2017, Vol. 24, no. 1, pp. 59-65.
37. Sallusto F., Zielinski C.E., Lanzavecchia A. Human Th17 subsets. *Eur. J. Immunol.*, 2012, Vol. 42, no. 9, pp. 2215-2220.
38. Shamaei M., Mortaz E., Pourabdollah M., Garssen J., Tabarsi P., Velayati A., Adcock I.M. Evidence for M2 macrophages in granulomas from pulmonary sarcoidosis: A new aspect of macrophage heterogeneity. *Hum. Immunol.*, 2018, Vol. 79, no. 1, pp. 63-69.
39. Shigehara K., Shijubo N., Ohmichi M., Takahashi R., Kon S., Okamura H., Kurimoto M., Hiraga Y., Tatsuno T., Abe S., Sato N. IL-12 and IL-18 are increased and stimulate IFN- γ production in sarcoid lungs. *J. Immunol.*, 2001, Vol. 166, no. 1, pp. 642-649.
40. Simonian P.L., Wehrmann F., Roark C.L., Born W.K., O'Brien R.L., Fontenot A.P. $\gamma\delta$ T cells protect against lung fibrosis via IL-22. *J. Exp. Med.*, 2010, Vol. 207, no. 10, pp. 2239-2253.
41. Starshinova A.A., Malkova A.M., Basantsova N.Y., Zinchenko Y.S., Kudryavtsev I.V., Ershov G.A., Soprun L.A., Mayevskaya V.A., Churilov L.P., Yablonskiy P.K. Sarcoidosis as an Autoimmune Disease. *Front. Immunol.*, 2020, Vol. 10, 2933. doi: 10.3389/fimmu.2019.02933.
42. Tarasidis A., Arce S. Immune response biomarkers as indicators of sarcoidosis presence, prognosis, and possible treatment: An immunopathogenic perspective. *Autoimmun Rev.*, 2020, Vol. 19, no. 3, 102462. doi: 10.1016/j.autrev.2020.102462.
43. Ten Berge B., Paats M.S., Bergen I.M., van den Blink B., Hoogsteden H.C., Lambrecht B.N., Hendriks R.W., Kleinjan A. Increased IL-17A expression in granulomas and in circulating memory T cells in sarcoidosis. *Rheumatology (Oxford)*, 2012, Vol. 51, no. 1, pp. 37-46.
44. Wacleche V.S., Goulet J.P., Gosselin A., Monteiro P., Soudeyrs H., Fromentin R., Jenabian M.A., Vartanian S., Deeks S.G., Chomont N., Routy J.P., Ancuta P. New insights into the heterogeneity of Th17 subsets contributing to HIV-1 persistence during antiretroviral therapy. *Retrovirology*, 2016, Vol. 13, no. 1, 59. doi: 10.1186/s12977-016-0293-6.
45. Zhang H., Costabel U., Dai H. The role of diverse immune cells in sarcoidosis. *Front. Immunol.*, 2021, Vol. 12, 788502. doi: 10.3389/fimmu.2021.788502.

Авторы:

Кудрявцев И.В. — к.б.н., старший научный сотрудник отдела иммунологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»; доцент кафедры иммунологии ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Лазарева Н.М. — к.м.н., старший лаборант кафедры иммунологии ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Баранова О.П. — к.м.н., старший научный сотрудник научно-исследовательского института интерстициальных и орфанных заболеваний легких, доцент кафедры пульмонологии ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Authors:

Kudryavtsev I.V., PhD (Biology), Senior Research Associate, Department of Immunology, Institute of Experimental Medicine; Associate Professor, Department of Immunology, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Lazareva N.M., PhD (Medicine), Senior Laboratory Assistant, Department of Immunology, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Baranova O.P., PhD (Medicine), Senior Research Associate, Research Institute of Interstitial and Orphan Lung Diseases, Associate Professor, Department of Pulmonology, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Серебрякова М.К. — научный сотрудник отдела иммунологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Сесъ Т.П. — д.б.н., профессор кафедры иммунологии ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Илькович М.М. — д.м.н., профессор, директор научно-исследовательского института интерстициальных и орфанных заболеваний легких, заведующий кафедрой пульмонологии ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Тотolian Арег А. — д.м.н., профессор, академик РАН, 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

Serebriakova M.K., Research Associate, Department of Immunology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Ses' T.P., PhD, MD (Biology), Professor, Department of Immunology, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Ilkovich M.M., PhD, MD (Medicine), Professor, Director, Research Institute of Interstitial and Orphan Lung Diseases, Head, Department of Pulmonology, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Totolian Areg A., PhD, MD (Medicine), Professor, Full Member, Russian Academy of Sciences, 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 06.01.2022
Принята к печати 22.01.2022

Received 06.01.2022
Accepted 22.01.2022

ОЦЕНКА КОЛИЧЕСТВА СУБПОПУЛЯЦИЙ CD4⁺ КЛЕТОК С ЭКСПРЕССИЕЙ ЭКТОНУКЛЕОТИДАЗ CD39 И CD73 У ДЕТЕЙ С ПСОРИАЗОМ

Купцова Д.Г.¹, Радыгина Т.В.¹, Петричук С.В.¹, Мурашкин Н.Н.^{1,2,3},
Хотко А.А.², Иванов Р.А.¹

¹ ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства
здравоохранения РФ, Москва, Россия

² ФГБУ ДПО «Центральная государственная медицинская академия» Управления делами Президента РФ,
Москва, Россия

³ ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова»
Министерства здравоохранения РФ (Сеченовский университет), Москва, Россия

Резюме. Пуринергическая передача сигналов модулирует системные и местные воспалительные реакции при иммуноопосредованных и аутоиммунных заболеваниях, включая псориаз. Внеклеточный АТФ является важной частью пуринергической регуляции, уровень которого регулируется каталитическими эффектами эктонуклеотидаз CD39 и CD73. Целью исследования была оценка количества регуляторных Т-клеток (Tregs), активированных Т-хелперов (Thact), Т-хелперов 17-го типа (Th17), экспрессирующих эктонуклеотидазы CD39 и CD73, у детей с вульгарным псориазом в зависимости от возраста, длительности заболевания и тяжести патологического процесса. Обследовано 114 детей с вульгарным псориазом (70 девочек и 44 мальчиков) и 41 здоровый ребенок в качестве группы сравнения (25 девочек и 16 мальчиков). Возраст детей с псориазом составил — 12,5 (10,1-15,8) года, для группы сравнения — 12,4 (7,4-16,1) года. Тяжесть псориаза оценивали по индексам PASI и BSA. Оценку количества клеток с экспрессией CD39 и CD73 на Tregs, Thact и Th17 выполняли методом проточной цитофлуориметрии. Наибольшее количество клеток с экспрессией CD39 выявлено в популяции Tregs, а с экспрессией CD73 — в Thact, как у детей с псориазом, так и в группе сравнения. У детей с псориазом содержание CD39⁺Th17 было ниже, а CD39⁺CD73⁺Thact и CD39⁺CD73⁺Th17 выше относительно группы сравнения ($p < 0,05$). Получено достоверное снижение CD73⁺Tregs, CD39⁺Thact, CD39⁺Th17, CD39⁺CD73⁺Thact и CD39⁺CD73⁺Th17 с возрастом у здоровых детей ($p < 0,05$). У пациентов с псориазом CD73⁺Th17 увеличивалось с возрастом. Выявлено снижение CD73⁺Th17 и увеличение CD39⁺CD73⁺Tregs при возрастании индексов PASI и BSA. При увеличении PASI (> 10) выделялись пациенты как с высоким содержанием CD39⁺Tregs, так и с низким, при этом количество CD39⁺Tregs в 48% случаев было ниже, в 35% было выше и только в 17% соответствовало значениям показателя здоровых детей. Учитывая роль эктонуклеотидаз CD39 и CD73 в формировании иммунного ответа

Адрес для переписки:

Купцова Дарья Геннадьевна
ФГАУ «Национальный медицинский
исследовательский центр здоровья детей»
Министерства здравоохранения РФ
119991, Россия, Москва, Ломоносовский пр., 2, стр. 1.
Тел.: 8 (499) 134-13-98.
Факс: 8 (499) 134-70-01.
E-mail: dg.kuptsova@gmail.com

Address for correspondence:

Kuptsova Darya G.
National Medical Research Center for Children's Health
119296, Russian Federation, Moscow,
Lomonosovsky ave., 2, bldg 1.
Phone: 7 (499) 134-13-98.
Fax: 7 (499) 134-70-01.
E-mail: dg.kuptsova@gmail.com

Образец цитирования:

Д.Г. Купцова, Т.В. Радыгина, С.В. Петричук,
Н.Н. Мурашкин, А.А. Хотко, Р.А. Иванов «Оценка
количества субпопуляций CD4⁺ клеток с экспрессией
эктонуклеотидаз CD39 и CD73 у детей с псориазом» // *Медицинская иммунология*, 2022.
Т. 24, № 3. С. 587-596.
doi: 10.15789/1563-0625-AOC-2487
© Купцова Д.Г. и соавт., 2022

For citation:

D.G. Kuptsova, T.V. Radigina, S.V. Petrichuk,
N.N. Murashkin, A.A. Khotko, R.A. Ivanov "Assessment
of CD4⁺ cells subpopulations with the expressing CD39 and
CD73 ectonucleotidases in children with psoriasis", *Medical
Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2022,
Vol. 24, no. 3, pp. 587-596.
doi: 10.15789/1563-0625-AOC-2487
DOI: 10.15789/1563-0625-AOC-2487

при иммуноопосредованных заболеваниях, мониторинг количества Tregs, Thact и Th17-клеток с экспрессией CD39 и CD73 у детей с псориазом может быть использован для контроля хронического воспаления.

Ключевые слова: дети, вульгарный псориаз, Т-хелперы, эктонуклеотидазы, CD39, CD73

ASSESSMENT OF CD4⁺ CELLS SUBPOPULATIONS WITH THE EXPRESSING CD39 AND CD73 ECTONUCLEOTIDASES IN CHILDREN WITH PSORIASIS

Kuptsova D.G.^a, Radigina T.V.^a, Petrichuk S.V.^a, Murashkin N.N.^{a, b, c}, Khotko A.A.^b, Ivanov R.A.^a

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

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

^c I. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation

Abstract. Purinergic signaling modulates systemic and local inflammatory responses in immune-mediated and autoimmune diseases, including psoriasis. Extracellular ATP is an important factor of purinergic regulation, and its levels are regulated by catalytic effects of CD39 and CD73 ectonucleotidases. The aim of the present study was to estimate the number of regulatory T cells (Tregs), activated T-helper cells (Thact), T-helper type 17 (Th17) expressing CD39 and CD73 ectonucleotidases in children with psoriasis vulgaris, depending on age, disease duration and severity of the pathological process. We have examined a total of 114 children with psoriasis vulgaris (70 girls and 44 boys) and 41 healthy children serving as a comparison group (25 girls and 16 boys). The age of children with psoriasis was 12.5 (10.1–15.8) years, and 12.4 (7.4–16.1) years for the comparison group. The severity of psoriasis was assessed by the PASI and BSA indices. The number of cells with CD39 and CD73 expression on Tregs, Thact and Th17 was estimated by flow cytometry. The highest number of CD39-expressing cells was found in the Tregs and CD73-expressing cells in Thact, both in children with psoriasis and in the comparison group. The number of CD39⁺Th17 was lower in children with psoriasis, but CD39⁺CD73⁺Thact and CD39⁺CD73⁺Th17 were higher than in comparison group ($p < 0.05$). There was a decreased number of CD73⁺Tregs, CD39⁺Thact, CD39⁺Th17, CD39⁺CD73⁺Thact and CD39⁺CD73⁺Th17 with age in healthy children ($p < 0.05$). In patients with psoriasis, the number of CD73⁺Th17 increased with age. A decrease in CD73⁺Th17, and an increase in CD39⁺CD73⁺Tregs with higher PASI and BSA indices were detected. An increased PASI (> 10) showed patients with both high and low CD39⁺Tregs, with CD39⁺Tregs being reduced in 48% of cases, increased in 35% and normal values in only 17% of cases. Monitoring the numbers of Tregs, Thact and Th17 cells expressing CD39 and CD73 in children with psoriasis may be used to evaluate chronic inflammation, given the role of CD39 and CD73 ectonucleotidases in shaping the immune response in immune-mediated diseases,

Keywords: children, psoriasis vulgaris, T helper, ectonucleotidases, CD39, CD73

Введение

Псориаз — хроническое рецидивирующее иммуноопосредованное воспалительное заболевание кожи [3, 35]. В настоящее время увеличивается распространенность данной патологии среди детей и подростков во всем мире [4, 26]. Псориаз, характеризующийся утолщением эпидермиса из-за повышенной пролиферации кератиноцитов, может проявляться в виде различных фенотипов [24]. Наиболее распространенной формой

является псориаз обыкновенный или вульгарный, составляющий до 90% случаев заболевания [16].

В последнее время патогенетическая модель псориаза была пересмотрена в соответствии с более широким и глубоким пониманием иммунных механизмов, ведущих к образованию характерных клинических проявлений заболевания [23]. Выделяют две общепризнанные фазы патогенеза псориаза: инициация/запуск заболевания и поддержание патологического воспаления [9, 13]. На

сегодняшний день большое внимание уделяется изучению молекулярных механизмов запуска псориаза [23, 32].

В патогенезе ранней стадии псориаза Ferrari D. и соавт. описали роль внеклеточного АТФ (еАТФ), который высвобождается в результате повреждения клеток кожи [12]. Внеклеточный АТФ является сильным провоспалительным сигналом и важной частью пуринергической регуляции [19, 38]. еАТФ включает активацию пуринергических рецепторов в клетке и/или в близлежащих клетках, тем самым регулируя клеточные функции [27]. Антагонистом еАТФ является внеклеточный аденозин, обладающий иммуносупрессивными свойствами [6]. Уровень еАТФ регулируется каталитическими эффектами эктонуклеотидтрифосфатдифосфогидролазы-1 (CD39) и экто-5'-нуклеотидазы (CD73), которые ответственны за превращение еАТФ в аденозин [25]. После выхода во внеклеточное пространство еАТФ гидролизуются до аденозиндифосфата и аденозинмонофосфата (АМФ) с помощью CD39, тогда как CD73 отвечает за превращение АМФ в аденозин [6, 25]. Показано, что ферменты CD39 и CD73 экспрессируются на плазматической мембране многих иммунных клеток [19, 31]. За счет продукции аденозина, эктонуклеотидазы CD39 и CD73 считаются ответственными за создание иммуносупрессивной среды [5]. Наиболее изучена экспрессия этих ферментов в популяции регуляторных Т-клеток (Tregs) [7, 29].

Показано, что пуринергическая передача сигналов модулирует системные и местные воспалительные реакции при иммуноопосредованных и аутоиммунных заболеваниях [1, 15, 33]. Изменение экспрессии эктонуклеотидаз CD39 и CD73 может регулировать продукцию аденозина и приводить к активации функций Т-хелперов 17-го типа (Th17) и активированных Т-хелперов (Thact) при хроническом воспалении [21, 34]. Показано снижение экспрессии CD39 на Tregs при обострении аутоиммунных заболеваний, таких как ревматоидный артрит, рассеянный склероз, воспалительные заболевания кишечника и др. [10, 14, 33]. Ранее проведенные исследования по изучению пуринергической регуляции у взрослых пациентов с псориазом выявили снижение экспрессии CD73 в популяции Tregs по сравнению со здоровыми людьми [18, 37]. Однако исследования пуринергической регуляции в поддержании хронического воспаления при псориазе у детей не проводились.

Целью нашего исследования была оценка количества популяций Tregs, Thact, Th17, экспрессирующих эктонуклеотидазы CD39 и CD73, у детей с вульгарным псориазом в зависимости от

возраста, длительности заболевания и тяжести патологического процесса.

Материалы и методы

В исследование включены 114 пациентов с вульгарным псориазом, в группу сравнения вошли здоровые дети ($n = 41$). Возраст детей с псориазом составил — Ме 12,54 (10,1-15,8) лет, для группы сравнения — Ме 12,4 (7,4-16,1). Критериями включения в исследование были: возраст обследованных детей — 4-18 лет, установленный диагноз «вульгарный псориаз». Критериями исключения являлись иные формы псориаза у детей, возраст участников старше 18 лет, невозможность получения образца крови. Всем детям проводили оценку тяжести псориаза по индексам PASI (Psoriasis Area and Severity Index) и BSA (Body Surface Area, %). В стадии регресса заболевания псориазом ($PASI \leq 10$) находилось 36 пациентов, а в прогрессирующей стадии ($PASI > 10$) — 78 детей. Пациенты с псориазом проходили обследование и лечение в отделении дерматологии с группой лазерной хирургии ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России в период с марта 2020 по август 2021 года. Проведенное исследование соответствовало этическим принципам Хельсинкской декларации (WMA Declaration of Helsinki — Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects, 2013) и было одобрено локальным этическим комитетом (протокол № 2 от 14.02.2020). Для участников исследования было получено информированное согласие родителей.

Всем детям было проведено иммунофенотипирование лимфоцитов периферической крови с определением популяций $CD4^+$ клеток, экспрессирующих эктонуклеотидазы CD39 и CD73. Для проведения исследований использовали периферическую кровь, взятую натощак в пробирки с антикоагулянтом ЭДТА. Пробоподготовка образцов включала в себя инкубирование в течение 20 минут в темном месте 100 мкл цельной крови с 10 мкл моноклональных антител, меченных флуорохромами. Для лизирования эритроцитов был использован лизирующий раствор BD FACS™ Lysing Solution (BD Biosciences, США), длительность инкубации с которым в темноте при комнатной температуре не превышала 10-12 минут. Запись полученных образцов проводили на проточном цитофлуориметре Novocyte (ACEA Biosciences, США).

Панель моноклональных антител для оценки относительного количества клеточных популяций и экспрессии маркеров CD39 и CD73 включала антитела, конъюгированные с флуорохромами: CD3 — PerCP (Sony Biotechnology, США); CD4 — FITC (Beckman Coulter, США);

CD127 – PE (Beckman Coulter, США); CD161 – PE (Beckman Coulter, США); CD25 – PE-Cy7 (Beckman Coulter, США); CD39 – APC (Sony Biotechnology, США); CD73 – APC-Cy7 (Sony Biotechnology, США). Методом пошагового гей-тирования проводили выделение следующих популяций клеток: CD4⁺CD25^{high}CD127^{low} – Tregs, CD4⁺CD25^{low}CD127^{high} – Thact, CD3⁺CD4⁺CD161⁺ – Th17, с последующей оценкой количества клеток, экспрессирующих CD39 и CD73.

Статистический анализ полученных данных проводили с помощью программы Statistica 10.0 (StatSoft, США). Описательная статистика количества клеток с экспрессией эктонуклеотидаз представлена в виде медианы (нижний – верхний квартили) – Me (Q_{0,25}–Q_{0,75}). Уровень статистической значимости различий между независимыми группами оценивали непараметрическим критерием Манна-Уитни, для оценки зависимых групп применяли критерий Вилкоксона. Для выявления корреляционных зависимостей использовали множественный пошаговый корреляционный анализ с исключением. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$. Частотные гистограммы по-

строены в программе Excel, распределения сравнивались между собой по критерию χ^2 .

Результаты

Проведенный анализ показал, что для детей с псориазом характерно достоверное увеличение относительного количества Th17 и Thact по сравнению со здоровыми детьми, по содержанию Tregs группы не отличались (табл. 1). Оценка относительного количества клеток, экспрессирующих эктонуклеотидазы CD39 и CD73, в исследуемых популяциях выявила достоверное снижение CD39⁺Th17 ($p = 0,006$) у детей с псориазом, при этом относительное количество CD39⁺CD73⁺Thact ($p = 0,011$) и CD39⁺CD73⁺Th17 ($p = 0,000$) было выше чем в группе сравнения (табл. 1).

Оценка содержания клеток с экспрессией эктонуклеотидазы CD39 в изученных популяциях показала, что наибольшее количество клеток с экспрессией CD39 характерно для популяции Tregs. Количество CD39⁺Tregs достоверно превышало CD39⁺Thact ($p = 0,000$) и CD39⁺Th17 ($p = 0,000$), при этом количество CD39⁺Th17 было

ТАБЛИЦА 1. КОЛИЧЕСТВО СУБПОПУЛЯЦИЙ CD4⁺ КЛЕТОК С ЭКСПРЕССИЕЙ CD39 И CD73 У ДЕТЕЙ С ПСОРИАЗОМ И В ГРУППЕ СРАВНЕНИЯ, Me (Q_{0,25}–Q_{0,75})

TABLE 1. NUMBER OF CD4⁺ CELLS SUBSETS EXPRESSING CD39 AND CD73 IN CHILDREN WITH PSORIASIS AND IN THE COMPARISON GROUP, Me (Q_{0,25}–Q_{0,75})

Показатели Parameters	Пациенты с псориазом Patients with psoriasis (n = 114)	Здоровые дети Healthy children (n = 41)	p
Tregs, % CD4	6,9 (6,1-8,4)	7,3 (6,4-9,6)	0,194
CD39 ⁺ Tregs, %	32,8 (19,6-42,2)	35,2 (29,1-39,4)	0,112
CD73 ⁺ Tregs, %	7,5 (5,7-11,3)	8,9 (7,3-11,1)	0,429
Thact, % CD4	19,1 (14,2-24,2)	18,8 (10,6-20,0)	0,011
CD39 ⁺ Thact, %	6,1 (2,8-8,9)	4,6 (4,2-6,2)	0,741
CD73 ⁺ Thact, %	18,2 (14,0-23,2)	17,6 (11,9-21,5)	0,157
Th17, % CD4	20,0 (15,6-24,8)	12,8 (10,9-19,5)	0,000
CD39 ⁺ Th17, %	8,3 (3,3-11,8)	9,6 (8,6-12,1)	0,006
CD73 ⁺ Th17, %	10,9 (8,2-16,3)	10,2 (7,3-14,4)	0,056
CD39 ⁺ CD73 ⁺ Tregs, %	3,6 (2,1-6,2)	4,0 (2,5-7,1)	0,340
CD39 ⁺ CD73 ⁺ Thact, %	1,3 (0,8-1,9)	0,7 (0,6-1,3)	0,011
CD39 ⁺ CD73 ⁺ Th17, %	1,4 (0,4-2,4)	0,8 (0,7-1,3)	0,000

Примечание. p – достоверность различий между группами, критерий Манна–Уитни.

Note. p, significance of differences between groups, Mann–Whitney U test.

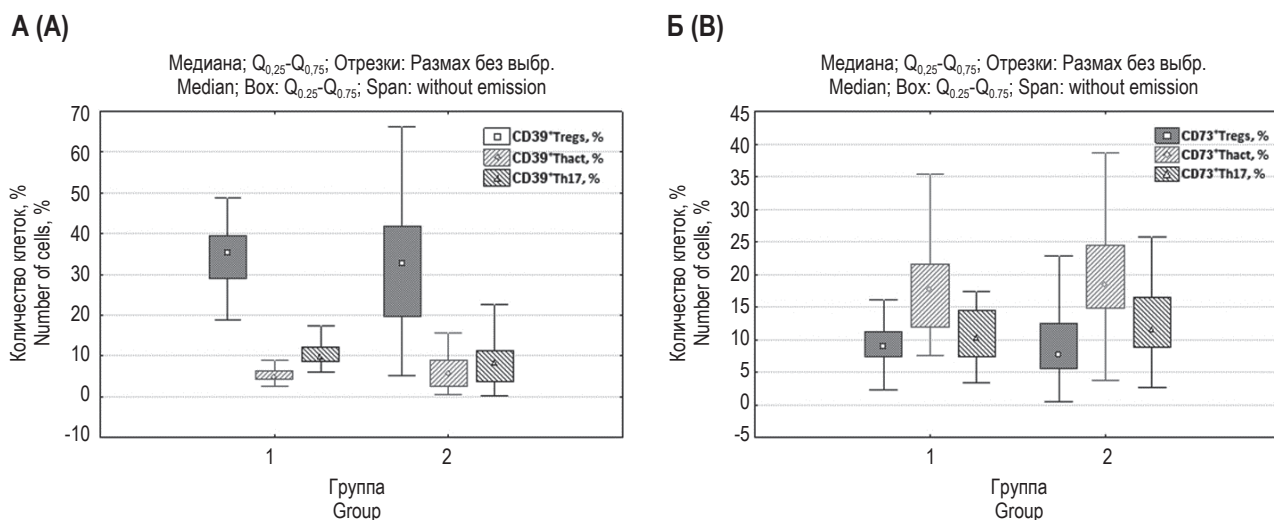


Рисунок 1. Относительное количество Tregs, Thact, Th17 с экспрессией CD39 (А) и CD73 (Б) у детей с псориазом и в группе сравнения

Примечание. Группа 1 – здоровые дети, группа 2 – дети с псориазом.

Figure 1. Relative numbers of Tregs, Thact, Th17 expressing CD39 (A) and CD73 (B) in children with psoriasis and in the comparison group.

Note. Group 1, healthy children; group 2, children with psoriasis.

достоверно выше, чем CD39⁺Thact ($p = 0,000$), как у здоровых детей, так и у пациентов с псориазом (рис. 1А).

Сравнение количества популяций Tregs, Thact, Th17 с экспрессией CD73 выявило достоверно более высокое количество CD73⁺Thact ($p = 0,000$) в обеих группах (рис. 1Б). У детей с псориазом относительное количество CD73⁺Th17 было достоверно выше CD73⁺Tregs ($p = 0,000$), в то время как в группе здоровых детей не отличалось ($p = 0,197$; рис. 1Б).

Анализ количества клеток с коэкспрессией CD39 и CD73 показал более высокие значения в популяции Tregs по сравнению с Thact ($p = 0,000$) и Th17 ($p = 0,000$), как у здоровых детей, так и у пациентов с псориазом. Относительное количество CD39⁺CD73⁺Thact и CD39⁺CD73⁺Th17 не отличались в обеих группах.

На следующем этапе был проведен анализ количества клеток с экспрессией эктонуклеотидаз CD39 и CD73 в зависимости от возраста детей и длительности заболевания псориазом. Группы обследованных детей были сопоставимы по возрасту ($p = 0,295$). Для детей с псориазом медиана возраста составила 12,5 (10,1-15,8), для группы сравнения – Ме 12,4 (7,4-16,1).

Корреляционный анализ показал достоверное увеличение относительного количества Thact и Th17 с возрастом как у детей с псориазом ($p = 0,000$), так и у здоровых детей ($p = 0,006$). У здоровых детей получено достоверное уве-

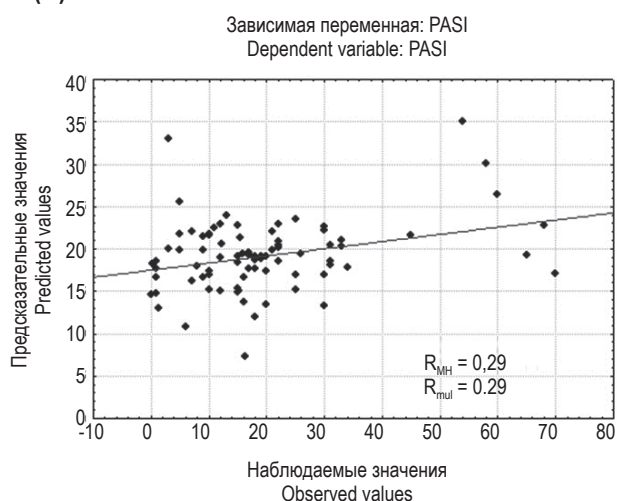
личение CD73⁺Th17 и снижение CD73⁺Tregs, CD39⁺Thact, CD39⁺Th17, CD39⁺CD73⁺Thact и CD39⁺CD73⁺Th17 с возрастом ($p < 0,05$). Для детей с псориазом показано только увеличение относительного количества CD73⁺Th17 с возрастом ($p = 0,000$). Зависимости количества клеток с экспрессией CD39 и CD73 в популяциях Tregs, Thact и Th17 от длительности заболевания псориазом у детей не выявлено.

Оценку тяжести заболевания псориазом у детей проводили по индексам PASI и BSA, которые изменялись: PASI – от 0 до 70 (Ме 13,3 (5-22)), BSA – от 0 до 100% (Ме 20 (4-40)). В стадии регресса заболевания псориазом ($PASI \leq 10$) находилось 36 пациентов, а в прогрессирующей стадии ($PASI > 10$) – 78 детей.

Множественный корреляционный анализ зависимости тяжести псориаза от содержания клеток с экспрессией CD39 и CD73 показал увеличение индекса PASI при снижении количества CD73⁺Th17 и увеличении количества CD39⁺CD73⁺Tregs (рис. 2А, табл. 2). Увеличение BSA наблюдается при снижении количества клеток CD73⁺Th17 и увеличении количества CD39⁺CD73⁺Tregs (рис. 2Б, табл. 2).

Учитывая большой интерес к изучению эктонуклеотидазы CD39 в популяции Tregs при аутоиммунных заболеваниях, мы детально проанализировали количество CD39⁺Tregs у детей с псориазом в зависимости от индекса PASI. Статистически значимых различий по количеству

А (A)



Б (B)

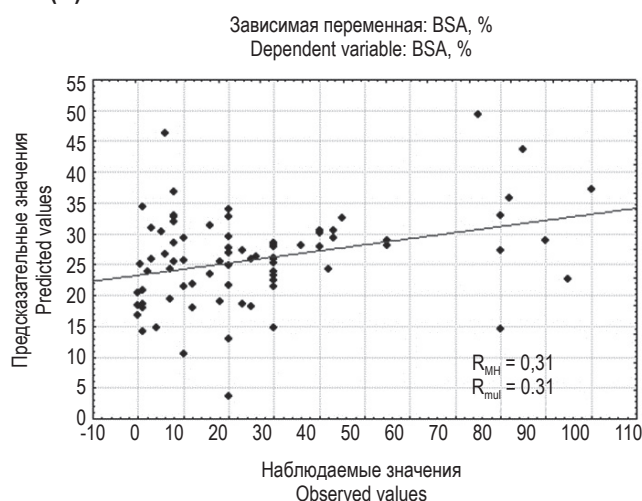


Рисунок 2. Зависимости предсказанных и наблюдаемых значений для PASI (А) и BSA (Б) в зависимости от количества клеток с экспрессией CD39 и CD73 у детей с псориазом

Примечание. R_{mh} – множественный коэффициент корреляции R.

Figure 2. Dependencies of predicted and observed values for PASI (A) and BSA (B) as a function of the number of cells expressing CD39 and CD73 in children with psoriasis

Note. R_{mul} , coefficient of multiple correlation R.

ТАБЛИЦА 2. УРАВНЕНИЯ МНОЖЕСТВЕННОЙ РЕГРЕССИИ ДЛЯ PASI И BSA В ЗАВИСИМОСТИ ОТ КОЛИЧЕСТВА КЛЕТОК С ЭКСПРЕССИЕЙ CD39 И CD73 У ДЕТЕЙ С ПСОРИАЗОМ

TABLE 2. MULTIPLE REGRESSION EQUATIONS FOR PASI AND BSA AS A FUNCTION OF THE NUMBER OF CELLS EXPRESSING CD39 AND CD73 IN CHILDREN WITH PSORIASIS

Уравнение множественной регрессии Multiple regression equation				
Зависимая переменная: PASI Dependent variable: PASI				
Переменная Variable	Коэффициент регрессии Regression coefficient	Ошибка коэффициента Error of coefficient	t-критерий t test	p
Свободный член Free term	23,06	3,9	5,87	0,000
CD73*Th17	-0,67	0,3	-2,19	0,03
CD39*CD73*Tregs	0,87	0,4	2,42	0,017
Зависимая переменная: BSA Dependent variable: BSA				
Свободный член Free term	35,9	6,55	5,48	0,000
CD73*Th17	-1,33	0,5	-2,65	0,009
CD39*CD73*Tregs	1,34	0,58	2,28	0,025

Примечание. Для построения уравнений регрессии использовали метод множественный пошаговой регрессией с исключениями. p – достоверность отличия коэффициентов регрессии от 0.

Note. Regression equations were constructed using the stepwise multiple regression method with exceptions. p, reliability of difference of regression coefficients from 0.

CD39⁺Tregs у детей с псориазом в стадии прогресса заболевания (Me 33,2 (14,3-46,2)) и регресса заболевания (Me 28,6 (24,8-36,5)) не выявлено ($p = 0,507$). При этом отмечался большой разброс показателя в обеих группах. В стадии регресса заболевания относительное количество CD39⁺Tregs в 44% случаев было ниже, в 14% было выше и в 42% случаев соответствовало значениям квартильного интервала у здоровых детей (29,1-39,4). У пациентов с псориазом в стадии прогресса заболевания относительное количество CD39⁺Tregs в 48% случаев было ниже, в 35% было выше и только в 17% случаев соответствовало значениям показателя здоровых детей.

Проведенный частотный анализ показал, что в стадии регресса заболевания распределение пациентов по CD39⁺Tregs не отличается от здоровых детей (критерий χ^2 ; $p > 0,01$) и достоверно отличается от стадии прогресса заболевания ($p < 0,01$; рис. 3). Распределение пациентов по CD39⁺Tregs в стадии прогресса заболевания псориазом представляет собой кривую с несколькими пиками, четко выделяются пациенты с низким и высоким процентом CD39⁺Tregs (рис. 3).

Обсуждение

Эктонуклеотидазы CD39 и CD73 играют фундаментальную роль в поддержании концентрации eATФ, тем самым контролируя биохимический состав воспалительной среды [5, 38]. В проведенном исследовании был применен протокол определения количества клеток с экспрессией эктонуклеотидов CD39 и CD73 в популяциях Tregs, Thact, Th17 клеток у детей с псориазом и в группе сравнения. Результаты исследования показали, что количество клеток с экспрессией CD39 и CD73 определяется популяцией клеток, что согласуется с данными полученные у взрослых пациентов [2, 5]. Содержание CD39⁺Tregs достоверно превышало количество клеток с экспрессией CD39 в популяциях Thact и Th17, при этом количество CD39⁺Th17 было выше, чем CD39⁺Thact и в группе сравнения и у детей с псориазом. Оценка количества клеток с экспрессией CD73 выявила наибольшее содержание в популяции Thact в обеих группах. Анализ количества клеток с коэкспрессией CD39 и CD73 выявил более высокие значения в популяции Tregs.

Выявлено, что у детей с псориазом относительное содержание Th17 клеток и Thact выше по сравнению со здоровыми детьми, а по количеству Tregs группы не отличались, что ранее также было показано у взрослых пациентов с псориазом [30].

Особый интерес представляет популяция Th17 клеток с экспрессией CD39 (supTh17), обладающая регуляторными и иммуносупрессивными свойствами [20, 22]. При ювенильном

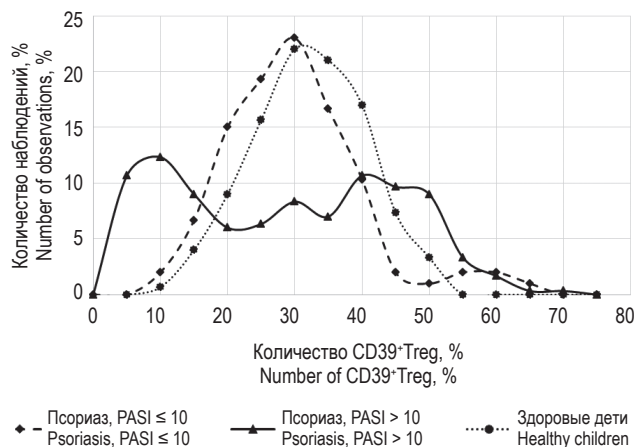


Рисунок 3. Распределение детей по количеству CD39⁺Tregs в стадиях регресса (PASI ≤ 10), прогресса (PASI > 10) заболевания и у здоровых детей

Figure 3. Distribution of children according to the number of CD39⁺Tregs in stages of disease regression (PASI ≤ 10), progression (PASI > 10) and in healthy children

аутоиммунном заболевании печени и воспалительных заболеваниях кишечника показано снижение содержания популяции supTh17 [20, 22]. В нашем исследовании также получено снижение supTh17 у детей с псориазом относительно группы сравнения, что может свидетельствовать о сохранении эффекторных свойств Th17 клеток. Известно, что количество supTh17-клеток регулируется концентрацией TGF- β и IL-6, которые могут запускать дифференцировку Th17 клеток, тем самым поддерживая хроническое воспаление [6, 36]. Количество клеток с коэкспрессией CD39⁺CD73⁺ в популяции Thact было выше, чем в группе сравнения, что согласуется с результатами полученные Han L. и соавт. у взрослых пациентов с псориазом [18]. По нашим данным, у детей с псориазом количество клеток с коэкспрессией CD39 и CD73 в популяции Th17 также было выше, чем у здоровых детей.

Известно, что при анализе содержания популяций лимфоцитов у детей необходимо учитывать возрастную динамику показателей. В нашем исследовании получено увеличение относительного количества Thact и Th17 с возрастом, при этом количество Tregs не зависело от возраста для всех обследованных детей. Оценка относительного количества клеток с экспрессией CD39 и CD73 у здоровых детей показала снижение CD73⁺Tregs, CD39⁺Thact, CD39⁺Th17, CD39⁺CD73⁺Tregs, CD39⁺CD73⁺Thact и увеличение CD73⁺Th17 с возрастом, при этом относительное количество CD39⁺Tregs от возраста не зависело. Ранее показано увеличение количества CD39⁺CD4⁺-клеток с возрастом у взрослых [1, 11, 17]. У детей с псориазом, в отличие от показателей здоровых детей, с возрастом увеличивается лишь относитель-

ное количество CD73⁺Th17, которые повторяют динамику общей популяции Th17 с возрастом.

Зависимости количества клеток в популяциях Tregs, Thact и Th17 с экспрессией CD39 и CD73 от длительности заболевания псориазом у детей не выявлено. Можно предположить, что экспрессия эктонуклеотидаз CD39 и CD73 в популяциях CD4⁺ Т-клеток в большей степени определяется тяжестью псориаза у детей, чем их возрастом и длительностью заболевания.

Корреляционный анализ показал снижение количества CD73⁺Th17 и увеличение количества CD39⁺CD73⁺Tregs при увеличении индексов PASI и BSA у детей с псориазом, что согласуется с данными Gordon-Smith S.B. и соавт. об обратной корреляции экспрессии CD73 и продукции аденозина с тяжестью ювенильного идиопатического артрита [8].

Полученные нами данные согласуются с другими результатами авторов о том, что эктонуклеотидаза CD39 наиболее часто экспрессируется в популяции Tregs [14, 29]. Результаты исследования Han L. и соавт. по оценке количества CD39⁺Tregs, полученные от 10 взрослых пациентов с вульгарным псориазом, не показали

достоверных отличий относительно здоровых доноров, но показали снижение CD39⁺Tregs при пустулезном псориазе [18]. В нашем исследовании мы также не получили достоверных отличий, однако получили большой разброс показателя CD39⁺Tregs.

У детей с псориазом при увеличении PASI (> 10) наблюдается большой разброс показателя CD39⁺Tregs, выделяются пациенты как с высоким содержанием CD39⁺Tregs, так и с низким. С чем связано такое распределение CD39⁺Tregs предстоит выяснить. Можно предположить, что данный факт связан с разной активностью эктонуклеотидазы CD39.

Заключение

Учитывая роль эктонуклеотидаз CD39 и CD73 в формировании иммунного ответа при иммуноопосредованных заболеваниях, мониторинг количества Tregs, Thact и Th17 клеток с экспрессией CD39 и CD73 у детей с псориазом, может быть использован для контроля хронического воспаления и разработки таргетных методов лечения псориаза.

Список литературы / References

1. Головкин А.С., Асадуллина И.А., Кудрявцев И.В. Пуринергическая регуляция основных физиологических и патологических процессов // Медицинская иммунология, 2018. Т. 20, № 4. С. 463-476. [Golovkin A.S., Asadullina I.A., Kudryavtsev I.V. Purinergic regulation of basic physiological and pathological processes. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2018, Vol. 20, no. 4, pp. 463-476. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2018-4-463-476.
2. Кудрявцев И.В., Лазарева Н.М., Баранова О.П., Головкин А.С., Исаков Д.В., Серебрякова М.К., Сесь Т.П., Илькович М.М., Тотолян А.А. Экспрессия CD39 регуляторными Т-лимфоцитами при хроническом и остром саркоидозе // Медицинская иммунология, 2019. Т. 21, № 3. С. 467-478. [Kudryavtsev I.V., Lazareva N.M., Baranova O.P., Golovkin A.S., Isakov D.V., Serebriakova M.K., Ses' T.P., Ilkovich M.M., Totolian A.A. CD39⁺ Expression by regulatory T cells in pulmonary sarcoidosis and Lofgren's syndrome. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2019, Vol. 21, no. 3, pp. 467-478. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2019-3-467-478.
3. Мурашкин Н.Н., Круглова Л.С., Коваленко Ю.А., Амбарчян Э.Т., Епишев Р.В., Материкин А.И., Опрятин Л.А., Иванов Р.А., Куколева Д.С., Купцова Д.Г., Помазанова М.Ю., Козырь Я.В. Коморбидности псориаза в детском возрасте // Вопросы современной педиатрии, 2020. Т. 19, № 6. С. 460-467. [Murashkin N.N., Kruglova L.S., Kovalenko I.A., Ambarchian E.T., Epishev R.V., Materikin A.I., Opryatyn L.A., Ivanov R.A., Kukoleva D.S., Kuptsova D.G., Pomazanova M.Yu., Kozyr Y.V. Psoriasis comorbidities in childhood. *Voprosy sovremennoy pediatrii = Current Pediatrics*, 2020, Vol. 19, no. 6, pp. 460-467. (In Russ.)]
4. Мурашкин Н.Н., Материкин А.И., Амбарчян Э.Т., Епишев Р.В., Опрятин Л.А., Иванов Р.А., Куколева Д.С., Купцова Д.Г., Помазанова М.Ю. Псориаз и псориатический артрит в детском возрасте // Вопросы современной педиатрии, 2020. Т. 19, № 6. С. 444-451. [Murashkin N.N., Materikin A.I., Ambarchian E.T., Epishev R.V., Opryatyn L.A., Ivanov R.A., Kukoleva D.S., Kuptsova D.G., Pomazanova M.U. Psoriasis and psoriatic arthritis in childhood psoriasis and psoriatic arthritis in childhood. *Voprosy sovremennoy pediatrii = Current Pediatrics*, 2020, Vol. 19, no. 6, pp. 444-451. (In Russ.)]
5. Allard B., Longhi M.S., Robson S.C., Stagg J. The ectonucleotidases CD39 and CD73: Novel checkpoint inhibitor targets. *Immunol. Rev.*, 2017, Vol. 276, no. 1, pp. 121-144.
6. Bono M.R., Fernandez D., Flores-Santibanez F., Roseblatt M., Sauma D. CD73 and CD39 ectonucleotidases in T cell differentiation: Beyond immunosuppression. *FEBS Lett.*, 2015, Vol. 589, no. 22, pp. 3454-3460.
7. Borsellino G., Kleinewietfeld M., Di Mitri D., Sternjak A., Diamantini A., Giometto R., Höpner S., Centonze D., Bernardi G., Dell'Acqua M.L., Rossini P.M., Battistini L., Röttschke O., Falk K. Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3⁺ Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. *Blood*, 2007, Vol. 110, no. 4, pp. 1225-1232.

8. Botta Gordon-Smith S., Ursu S., Eaton S., Moncrieffe H., Wedderburn L.R. Correlation of low CD73 expression on synovial lymphocytes with reduced adenosine generation and higher disease severity in juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheumatol.*, 2015, Vol. 67, no. 2, pp. 545-554.
9. Chiricozzi A., Romanelli P., Volpe E., Borsellino G., Romanelli M. Scanning the Immunopathogenesis of Psoriasis. *Int. J. Mol. Sci.*, 2018, Vol. 19, no. 1, 179. doi: 10.3390/ijms19010179.
10. Dong K., Gao Z.W., Zhang H.Z. The role of adenosinergic pathway in human autoimmune diseases. *Immunol. Res.*, 2016, Vol. 64, no. 5, pp. 1133-1141.
11. Fang F., Yu M., Cavanagh M.M., Hutter Saunders J., Qi Q., Ye Z., Le Saux S., Sultan W., Turgano E., Dekker C.L., Tian L., Weyand C.M., Goronzy J.J. Expression of CD39 on Activated T Cells Impairs their Survival in Older Individuals. *Cell Rep.*, 2016, Vol. 14, no. 5, pp. 1218-1231.
12. Ferrari D., Casciano F., Secchiero P., Reali E. Purinergic Signaling and Inflammasome Activation in Psoriasis Pathogenesis. *Int. J. Mol. Sci.*, 2021, Vol. 22, no. 17, 9449. doi: 10.3390/ijms22179449.
13. Georgescu S.R., Tampa M., Caruntu C., Sarbu M.I., Mitran C.I., Mitran M.I., Matei C., Constantin C., Neagu M. Advances in understanding the immunological pathways in psoriasis. *Int. J. Mol. Sci.*, 2019, Vol. 20, no. 3, 739. doi: 10.3390/ijms20030739.
14. Gibson D.J., Elliott L., McDermott E., Tosetto M., Keegan D., Byrne K., Martin S.T., Rispens T., Cullen G., Mulcahy H.E., Cheifetz A.S., Moss A.C., Robson S.C., Doherty G.A., Ryan E.J. Heightened Expression of CD39 by Regulatory T lymphocytes is associated with therapeutic remission in inflammatory bowel disease. *Inflamm. Bowel Dis.*, 2015, Vol. 21, no. 12, pp. 2806-2814.
15. Giuliani A.L., Sarti A.C., Di Virgilio F. Ectonucleotidases in Acute and Chronic Inflammation. *Front. Pharmacol.*, 2021, Vol. 11, 619458. doi: 10.3389/fphar.2020.619458.
16. Griffiths C.E.M., Armstrong A.W., Gudjonsson J.E., Barker J.N.W.N. Psoriasis. *Lancet*, 2021, Vol. 397, no. 10281, pp. 1301-1315.
17. Guzman-Flores J.M., Cortez-Espinosa N., Cortés-García J.D., Vargas-Morales J.M., Cataño-Cañizalez Y.G., Rodríguez-Rivera J.G., Portales-Perez D.P. Expression of CD73 and A2A receptors in cells from subjects with obesity and type 2 diabetes mellitus. *Immunobiology*, 2015, Vol. 220, no. 8, pp. 976-984.
18. Han L., Sugiyama H., Zhang Q., Yan K., Fang X., McCormick T.S., Cooper K.D., Huang Q. Phenotypical analysis of ectoenzymes CD39/CD73 and adenosine receptor 2A in CD4⁺ CD25^{high} Foxp3⁺ regulatory T-cells in psoriasis. *Australas. J. Dermatol.*, 2018, Vol. 59, no. 1, pp. 31-38.
19. Junger W.G. Immune cell regulation by autocrine purinergic signalling. *Nat. Rev. Immunol.*, 2011, Vol. 11, no. 3, pp. 201-12.
20. Liberal R., Grant C.R., Ma Y., Csizmadia E., Jiang Z.G., Heneghan M.A., Yee E.U., Mieli-Vergani G., Vergani D., Robson S.C., Longhi M.S. CD39 mediated regulation of Th17-cell effector function is impaired in juvenile autoimmune liver disease. *J. Autoimmun.*, 2016, Vol. 72, pp. 102-112.
21. Longhi M.S., Vuerich M., Kalbasi A., Kenison J.E., Yeste A., Csizmadia E., Vaughn B., Feldbrugge L., Mitsuhashi S., Wegiel B., Otterbein L., Moss A., Quintana F.J., Robson S.C. Bilirubin suppresses Th17 immunity in colitis by upregulating CD39. *J.C.I. Insight.*, 2017, Vol. 2, no. 9, e92791. doi: 10.1172/jci.insight.92791.
22. Longhi M.S., Moss A., Bai A., Wu Y., Huang H., Cheifetz A., Quintana F.J., Robson S.C. Characterization of human CD39⁺ Th17 cells with suppressor activity and modulation in inflammatory bowel disease. *PLoS One*, 2014, Vol. 9, no. 2, e87956. doi: 10.1371/journal.pone.0087956.
23. Ogawa E., Sato Y., Minagawa A., Okuyama R. Pathogenesis of psoriasis and development of treatment. *J. Dermatol.*, 2018, Vol. 45, no. 3, pp. 264-272.
24. Raharja A., Mahil S.K., Barker J.N. Psoriasis: a brief overview. *Clin. Med. (Lond)*, 2021, Vol. 21, no. 3, pp. 170-173.
25. Regateiro F.S., Cobbald S.P., Waldmann H. CD73 and adenosine generation in the creation of regulatory microenvironments. *Clin. Exp. Immunol.*, 2013, Vol. 171, no. 1, pp. 1-7.
26. Relvas M., Torres T. Pediatric Psoriasis. *Am. J. Clin. Dermatol.*, 2017, Vol. 18, no. 6, pp. 797-811.
27. Robson S.C., Sévigny J., Zimmermann H. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance. *Purinergic Signal.*, 2006, Vol. 2, no. 2, pp. 409-430.
28. Savio L.E.B., Robson S.C., Longhi M.S. Ectonucleotidase modulation of lymphocyte function in gut and liver. *Front. Cell. Dev. Biol.*, 2021, Vol. 8, 621760. doi: 10.3389/fcell.2020.621760.
29. Schuler P.J., Saze Z., Hong C.S., Muller L., Gillespie D.G., Cheng D., Harasymczuk M., Mandapathil M., Lang S., Jackson E.K., Whiteside T.L. Human CD4⁺CD39⁺ regulatory T cells produce adenosine upon co-expression of surface CD73 or contact with CD73⁺ exosomes or CD73⁺ cells. *Clin. Exp. Immunol.*, 2014, Vol. 177, no. 2, pp. 531-543.
30. Shi Y., Chen Z., Zhao Z., Yu Y., Fan H., Xu X., Bu X., Gu J. IL-21 Induces an imbalance of Th17/Treg cells in moderate-to-severe plaque psoriasis patients. *Front. Immunol.*, 2019, Vol. 10, 1865. doi: 10.3389/fimmu.2019.01865
31. Takenaka M.C., Robson S., Quintana F.J. Regulation of the T cell response by CD39. *Trends Immunol.*, 2016, Vol. 37, no. 7, pp. 427-439.
32. Tseng J.C., Chang Y.C., Huang C.M., Hsu L.C., Chuang T.H. Therapeutic development based on the immunopathogenic mechanisms of psoriasis. *Pharmaceutics*, 2021, Vol. 13, no. 7, 1064. doi: 10.3390/pharmaceutics13071064.

33. Vuerich M., Robson S.C., Longhi M.S. Ectonucleotidases in intestinal and hepatic inflammation. *Front. Immunol.*, 2019, Vol. 10, no. 507. doi: 10.3389/fimmu.2019.00507.
34. Vuerich M., Harshe R.P., Robson S.C., Longhi M.S. Dysregulation of adenosinergic signaling in systemic and organ-specific autoimmunity. *Int. J. Mol. Sci.*, 2019, Vol. 20, no. 528, pp. 1-15.
35. Yamanaka K., Yamamoto O., Honda T. Pathophysiology of psoriasis: A review. *J. Dermatol.*, 2021, Vol. 48, no. 6, pp. 722-731.
36. Zeng J., Ning Z., Wang Y., Xiong H. Implications of CD39 in immune-related diseases. *Int. Immunopharmacol.*, 2020, Vol. 89, 107055. doi: 10.1016/j.intimp.2020.107055.
37. Zhang H.Y., Yan K.X., Huang Q., Ma Y., Fang X., Han L. Target tissue ectoenzyme CD39/CD73-expressing Foxp3⁺ regulatory T cells in patients with psoriasis. *Clin. Exp. Dermatol.*, 2015, Vol. 40, no. 2, pp. 182-191.
38. Zimmermann H. Ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolases and ecto-5'-nucleotidase in purinergic signaling: how the field developed and where we are now. *Purinergic Signal.*, 2021, Vol. 17, no. 1, pp. 117-125.

Авторы:

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

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

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

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

Хотко А.А. — к.м.н., доцент кафедры дерматовенерологии и косметологии ФГБУ ДПО «Центральная государственная медицинская академия» Управления делами Президента РФ, Москва, Россия

Иванов Р.А. — врач-дерматовенеролог отделения дерматологии с группой лазерной хирургии ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Authors:

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

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

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

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

Khotko A.A., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Dermatology and Cosmetology, Central State Medical Academy of Department of Presidential Affairs, Moscow, Russian Federation

Ivanov R.A., Dermato-venerologist, Dermatology Department with Laser Surgery Unit, National Medical Research Center for Children's Health, Moscow, Russian Federation

ДИНАМИКА УРОВНЯ АУТОАНТИТЕЛ К КОЛЛАГЕНУ I И III ТИПОВ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ И КОЖНОМ ЭКССУДАТЕ ПРИ АТОПИЧЕСКОМ ДЕРМАТИТЕ

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

ФГБОУ ВО «Читинская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения РФ,
г. Чита, Россия

Резюме. Согласно клиническим рекомендациям Российского общества дерматовенерологов и косметологов, атопический дерматит является хроническим аллергическим генетически детерминированным дерматозом мультифакторной природы. Однако существуют нюансы, которые ставят под сомнение аллергическую природу дерматоза. Например, согласно литературным данным, не у всех пациентов повышается синтез иммуноглобулина Е, часть пациентов имеет торпидность к антигистаминным препаратам, а при осмотре кожи больного атопическим дерматитом выявляется абсолютный полиморфизм высыпаний, что не является характерным для реактивного типа аллергических реакций. На сегодняшний день, по данным современной литературы, предполагается аутоиммунная теория развития атопического дерматита, однако объективных доказательств теории не представлено, что привлекло наше внимание к изучению данной проблемы. Цель настоящего исследования заключалась в выявлении аутоиммунных механизмов патогенеза атопического дерматита.

В исследовании участвовали 40 подростков и 40 взрослых с ограниченной и распространенной формами атопического дерматита. Обследование проводили в период обострения и ремиссии заболевания. У всех пациентов выполняли забор крови и кожного экссудата. Контрольную группу составили 30 практически здоровых добровольцев, у которых кожный экссудат получали методом «кожного окна», согласно медицинской технологии Климова В.В. и соавт. «Способ оценки минимальной воспалительной активности кожи при атопическом дерматите в стадии ремиссии». В сыворотке крови и кожном экссудате определяли концентрацию аутоантител класса IgG к коллагену I и III типов методом ИФА с использованием готовых панелей AEA571Hu ELISA Kit for Anti-Collagen Type I Antibody (США), AEA176Hu ELISA Kit for Anti-Collagen Type III Antibody (США) согласно протоколам производителя.

Мы впервые изучили концентрацию аутоантител к коллагену кожи I и III типов у пациентов с атопическим дерматитом на системном уровне и в патологическом кожном процессе. Выявлено, что относительно группы здоровых добровольцев концентрация аутоантител к коллагену I и III типов увеличивается у всех пациентов с атопическим дерматитом как в период обострения, так и в ремис-

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, Chita,
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, А.В. Котенко «Динамика уровня аутоантител к коллагену I и III типов в сыворотке крови и кожном экссудате при атопическом дерматите» // Медицинская иммунология, 2022. Т. 24, № 3. С. 597-604.
doi: 10.15789/1563-0625-TCO-2471
© Кибалина И.В. и соавт., 2022

For citation:

I.V. Kibalina, N.N. Tsybikov, E.V. Fefelova, A.V. Kotenko
“Time course of autoantibodies to collagen type I and III in blood serum and skin exudate in atopic dermatitis”, Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2022, Vol. 24, no. 3, pp. 597-604.
doi: 10.15789/1563-0625-TCO-2471
DOI: 10.15789/1563-0625-TCO-2471

сию заболевания. Максимальные показатели аутоантител к коллагену I и III типов зафиксированы в период формирования клинических симптомов дерматоза в сыворотке крови, однако в кожном экссудате выявлены их низкие концентрации.

Перманентно высокие концентрации аутоантител к коллагену I и III типов в сыворотке крови в период обострения и ремиссии atopического дерматита и их низкий уровень в кожном экссудате свидетельствуют о формировании циркулирующих и преципитирующих иммунных комплексов, что позволяет рассматривать atopический дерматит как аутоиммунный процесс.

Ключевые слова: atopический дерматит, аутоантитела, коллаген, аутоиммунный процесс, патогенез, аллергическая реакция

TIME COURSE OF AUTOANTIBODIES TO COLLAGEN TYPE I AND III IN BLOOD SERUM AND SKIN EXUDATE IN ATOPIC DERMATITIS

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

Chita State Medical Academy, Chita, Russian Federation

Abstract. In accordance with Clinical Guidelines of the Russian Society of Dermatovenerologists and Cosmetologists, atopic dermatitis is a chronic allergic genetically determined dermatosis of a multifactorial nature. There are, however, some aspects that challenge the allergic nature of dermatosis. For example, according to literature data, not all the patients have increased synthesis of immunoglobulin E, some of them are torpid to antihistamine treatment, and, when examining the skin of some patients with atopic dermatitis, an absolute polymorphism of rashes is revealed, thus being not typical to the reagin-type allergic reactions. According to modern data, autoimmune theory is assumed for the mechanisms of atopic dermatitis. However, objective proofs of this theory have not been presented, thus drawing our attention to the studies of this issue. The aim of this study was to identify autoimmune pathogenetic mechanisms of atopic dermatitis.

The study included 40 adolescents and 40 adult patients with limited and extended forms of atopic dermatitis. The patients were evaluated during the period of exacerbation and remission of the disease. Blood and skin exudates samples were taken from all the patients. The control group consisted of 30 practically healthy volunteers in whom skin exudate was obtained by the "skin window" technique as proposed by Klimov V.V. et al. "A method for assessing minimal inflammatory activity of skin in atopic dermatitis in remission". Concentrations of IgG autoantibodies to collagen types I and III were determined in blood serum and skin exudate samples applying ELISA techniques with ready-made panels AEA571Hu ELISA Kit for Anti-Collagen Type I Antibody (USA), AEA176Hu ELISA Kit for Anti-Collagen Type III Antibody (USA), according to the manufacturer's protocols.

For the first time, the contents of autoantibodies to skin collagen types I and III in the patients with atopic dermatitis we studied in parallel, i.e., at systemic level and in affected skin. If compared to the group of healthy volunteers, the concentration of autoantibodies to collagen types I and III was found to be increased in all the patients with atopic dermatitis, both during exacerbation and in remission of the disease. The maximal values of autoantibodies to collagen types I and III were recorded in blood serum upon development of clinical symptoms of dermatosis, along with low contents of these antibodies detectable in their skin exudates.

Permanently high concentrations of autoantibodies to collagen types I and III in blood serum at exacerbation and remission of atopic dermatitis, and their low level in their skin exudate suggest emergence of circulating and precipitating immune complexes, thus allowing us to consider atopic dermatitis as an autoimmune process.

Keywords: atopic dermatitis, autoantibodies, collagen, autoimmunity, pathogenesis, allergic reaction

Введение

В последние годы для исследователей приобрела актуальность тема аутореактивности в патогенезе атопического дерматита, а в качестве триггерного фактора определены сенсибилизация к аллергенам и изменение микробиоты кожи, запускающие каскад иммунных реакций и инициирующие воспалительный процесс [6].

Известно, что Т-хелперы 17-го типа, продуцируя IL-22 и IL-17, могут способствовать развитию аутоиммунных реакций [1, 2, 11]. Однако, несмотря на актуальность темы и многочисленные исследования, проводимые в разных странах, остаются белые пятна в изучении механизмов развития атопического дерматита и с каждым новым открытием подвергаются сомнению предыдущие достижения.

В научной литературе встречаются предположения о формировании аутоиммунного компонента в патогенезе атопического дерматита, обоснованного схожестью между структурными белками клеток и аллергенами [4, 6, 10]. Это обусловлено реагированием аутоантител класса IgE с белком Homs1, находящимся в эпидермисе, с последующим образованием иммунных комплексов, активирующих Fc-рецепторы на иммунокомпетентных клетках [9, 10]. Не исключен другой механизм с вовлечением аутоантител класса IgG к кератиноцитам с развитием антителозависимой клеточной цитотоксичности, что может подтверждаться выявленными при гистологических исследованиях скоплениями гранулоцитов. Возможно, аутоантитела класса IgG блокируют рецепторы клеток кожи или изменяют их фенотип (трансформация HLA I класса), вызывая апоптоз клетки или ее гибель Т-киллерами [9, 10].

По данным современной литературы, патологические реакции, характерные для атопического дерматита протекают с участием эндотелиальных клеток, базофилов и тучных клеток, расположенных в сосочковом слое дермы [4, 10]. Они способны синтезировать биологически активные вещества, предрасполагающие к неспецифическим патологическим реакциям сосудов и поддерживающие воспалительный процесс в коже [4]. Перманентные иммунные реакции в коже при атопическом дерматите характеризуют не только остроту воспалительного процесса, но и способствуют более длительному течению патологических реакций как в коже, так и на системном уровне [4].

Согласно клиническим рекомендациям Российского общества дерматовенерологов и косметологов, атопический дерматит является хроническим аллергическим генетически детерминированным мультифакторным дерматозом [6]. Однако существуют нюансы, которые ставят под сомнение аллергическую природу заболевания. Например, согласно литературным данным, не у всех пациентов повышается синтез антител класса IgE, часть пациентов имеет торпидность к антигистаминным препаратам, а клинические проявления дерматоза характеризуются полиморфными морфологическими элементами, что не является характерным для реактивного типа аллергических реакций.

На сегодняшний день существующая аутоиммунная теория развития атопического дерматита не имеет объективных доказательств, что привлекло наше внимание к изучению данной проблемы. **Цель настоящего исследования** заключалась в выявлении аутоиммунных механизмов патогенеза атопического дерматита.

Материалы и методы

В исследование включено 80 пациентов, которые были распределены в две группы (подростки — от 13 до 18 лет ($n = 40$) и взрослые от 18 до 44 лет ($n = 40$)) и две подгруппы (пациенты с распространенным ($n = 20$ в каждой группе) и ограниченным атопическим дерматитом ($n = 20$ в каждой группе)). Контрольную группу составили тридцать практически здоровых добровольцев. Пациенты и здоровые добровольцы получили полную информацию об аспектах проведения исследования, протокол которого был одобрен Локальным этическим комитетом ФГБОУ ВО «Читинская государственная медицинская академия» Минздрава России.

Диагностику и лечение пациентов с атопическим дерматитом проводили на базе ГУЗ «Краевой кожно-венерологический диспансер» Минздрава Забайкальского края в г. Чита согласно клиническим рекомендациям РОДВК [5]. Нами были определены критерии включения в исследование — диагноз «атопический дерматит» более двух лет в анамнезе, продолжительность стадии ремиссии не менее 2 месяцев в рамках исследования, подписанное добровольное информированное согласие, отсутствие сопутствующих заболеваний даже в стадию ремиссии, а также сформированы критерии исключения, заключающиеся в наличии хронических заболеваний, по-

лучении системной и топической лекарственной или физиотерапии в течение двух месяцев до забора крови, беременность, лактация, симптомы микробного компонента в клинической картине заболевания.

В качестве биологического материала для исследования использовали сыворотку крови и кожный экссудат. Забор крови осуществляли в период обострения до назначения терапии и в ремиссию заболевания, центрифугировали, полученную сыворотку крови замораживали при -70°C и хранили до исследования. Кожный экссудат получали в период обострения дерматоза из экссудативных морфологических элементов, используя инсулиновый шприц и иглу 20G. У лиц контрольной группы кожный экссудат получали методом кожного окна по медицинской технологии Климова В.В. и соавт. «Способ оценки минимальной воспалительной активности кожи при atopическом дерматите в стадии ремиссии» [3].

Лабораторные исследования выполнены в ФГБОУ ВО «Читинская государственная медицинская академия» Минздрава России. Определение концентрации аутоантител к коллагену I и III типов в сыворотке крови и кожном экссудате осуществляли методом ИФА, используя готовые

панели AEA571Hu ELISA Kit for Anti-Collagen Type I Antibody, AEA176Hu ELISA Kit for Anti-Collagen Type III Antibody производства США согласно протоколам производителя.

Статистическая обработка лабораторных показателей осуществлялась с помощью пакета программ статистического анализа IBM SPSS Statistics Version 25.0. Показателем 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 дерматоза в разных возрастных группах). В статье показатели представлены медианой и межквартильными интервалами — $Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})$.

Результаты

Выявлено, что в контрольной группе подростков уровень аутоантител к коллагену I типа в сыворотке крови равен 28,44 (26,99-30,18) нг/мл, в контрольной группе взрослых составляет 27,34 (18,56-36,12) нг/мл, что значительно отличается от показателей в группах пациентов с atopиче-

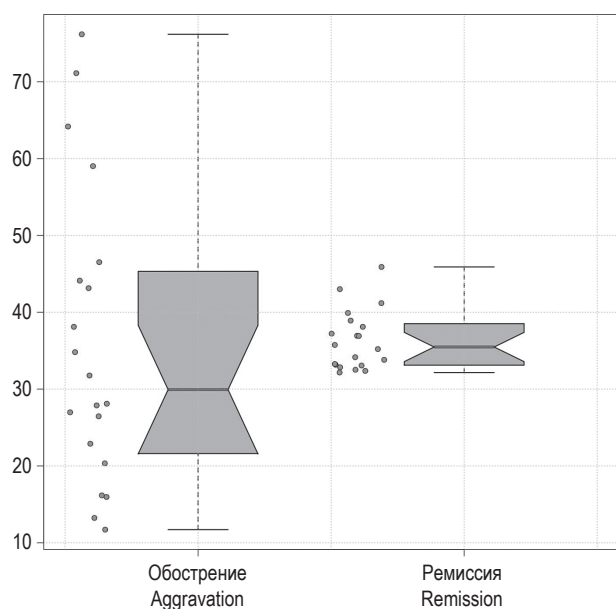


Рисунок 1. Концентрация аутоантител к коллагену I типа в сыворотке крови (нг/мл) у подростков с ограниченной формой atopического дерматита

Figure 1. Concentration of autoantibodies to type I collagen in blood serum (ng/ml) in adolescents with a limited form of atopical dermatitis

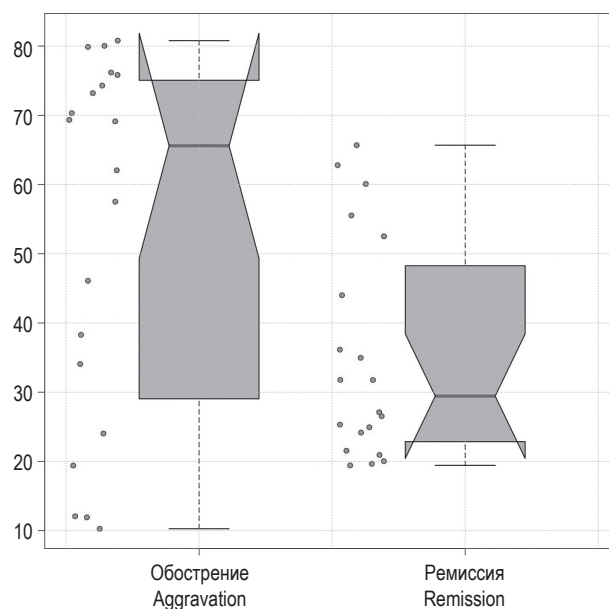


Рисунок 2. Концентрация аутоантител к коллагену I типа в сыворотке крови (нг/мл) у взрослых с распространенной формой atopического дерматита

Figure 2. Concentration of autoantibodies to type I collagen in blood serum (ng/ml) in adults with a common form of atopical dermatitis

ским дерматитом. При появлении клинических симптомов ограниченной формы атопического дерматита у подростков концентрация аутоантител к коллагену I типа соответствует 29,94 (21,62-45,32) нг/мл ($p_1 = 0,1$), в группе взрослых — 51,55 (43,79-58,97) нг/мл ($p_1 < 0,001$; $p_3 = 0,006$), что в 1,8 раза превышает данные контроля (рис. 1).

В ремиссию атопического дерматита концентрация аутоантител к коллагену I типа увеличивается как у подростков, так и у взрослых в 1,2 раза до 35,48 (33,12-38,52) нг/мл ($p_1 = 0,0002$; $p_2 = 0,9$) и 61,51 (51,58-65,35) нг/мл ($p_1 < 0,001$; $p_2 = 0,018$; $p_3 < 0,0001$) соответственно.

Мы определили увеличение уровня аутоантител к коллагену I типа при обострении симптомов распространенной формы атопического дерматита у всех пациентов: уровень аутоантител к коллагену I типа у подростков в сыворотке крови равен 50,83 (44,42-55,41) нг/мл ($p_1 < 0,00001$), превышая в 1,8 раза данные контрольной группы, однако у взрослых — 65,59 (29,05-75,05) нг/мл ($p_1 = 0,00002$; $p_3 = 0,04$), что в 2,9 раза выше контрольных значений (рис. 2).

В ремиссию при распространенной форме дерматоза у подростков уровень аутоантител к коллагену I типа увеличивается на 22% до 62,1 (52,03-76,05) нг/мл ($p_1 < 0,00001$; $p_2 = 0,9$), у взрослых уменьшается на 55% до 29,44 (22,86-48,26) нг/мл ($p_1 = 0,1$; $p_2 = 0,016$; $p_3 = 0,52$).

Концентрация аутоантител к коллагену I типа в кожном экссудате, полученном методом «кожного окна», у подростков контрольной группы составляет 27,63 (24,12-31,14) нг/мл, у взрослых — 26,43 (25,16-27,7) нг/мл. При ограниченной форме атопического дерматита концентрация аутоантител в группе подростков в 5,8 раза меньше при сравнении с контрольными данными и составляет 4,71 (3,97-5,27) нг/мл ($p_1 < 0,001$), у взрослых — в 6,1 раза, соответствуя уровню 4,32 (4,22-4,58) нг/мл ($p_1 < 0,001$; $p_3 = 0,22$). При распространенном кожном процессе концентрация аутоантител к коллагену I типа как у подростков, так и у взрослых ниже показателей контроля и данных в группах пациентов с ограниченной формой заболевания. У подростков уровень аутоантител составляет 4,35 (4,06-5,01) нг/мл ($p_1 < 0,001$; $p_4 = 0,36$), что меньше показателя здоровых добровольцев в 6,3 раза. У взрослых показатель снижен в 6,1 раза до 4,28 (3,82-4,92) нг/мл ($p_1 < 0,001$; $p_3 = 0,41$; $p_4 = 0,2$) по отношению к контрольным данным.

Таким образом, при сравнении динамики уровня аутоантител к коллагену I типа выявлено,

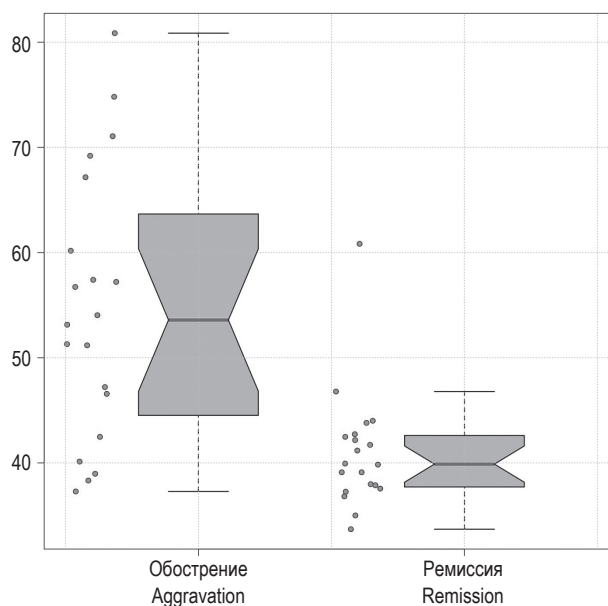


Рисунок 3. Концентрация аутоантител к коллагену III типа в сыворотке крови (нг/мл) у подростков с ограниченной формой атопического дерматита

Figure 3. Concentration of autoantibodies to type III collagen in blood serum (ng/ml) in adolescents with a limited form of atopic dermatitis

что концентрация исследуемого показателя как у подростков, так и у взрослых больше в сыворотке крови, чем в кожном экссудате. Так, у подростков с ограниченным атопическим дерматитом концентрация аутоантител к коллагену I типа в 6,3 раза больше в сыворотке крови, а при распространенном процессе — в 11,6 раза. У взрослых при ограниченном кожном процессе концентрация аутоантител к коллагену I типа в 11,9 раза больше в сыворотке крови, чем в кожном экссудате, а при распространенной форме дерматоза — в 15,3 раза.

Мы определили, что концентрация аутоантител к коллагену III типа в сыворотке крови у здоровых добровольцев значительно выше уровня аутоантител к коллагену III типа. Так, у подростков в группе контроля показатель равен 34,82 (33,85-36,19) нг/мл, у взрослых — 32,12 (28,79-35,45) нг/мл. Выявлено, что у подростков с ограниченным атопическим дерматитом в период появления клинических кожных симптомов уровень аутоантител составил 53,59 (44,53-63,67) нг/мл ($p_1 < 0,00001$), доминируя над контрольными значениями в 1,5 раза, у взрослых — 59,2 (52,2-62,46) нг/мл ($p_1 < 0,000001$; $p_3 = 0,004$), что в 1,8 раза превосходит данные здоровых добровольцев. У подростков в ремиссию концентрация

снижается на 25,6% до 39,89 (37,72-42,61) нг/мл ($p_1 = 0,06$; $p_2 = 0,0008$), оставаясь больше показателя контрольной группы (рис. 3).

У взрослых с ограниченным атопическим дерматитом в ремиссию концентрация увеличивается до 65,47 (56,02-71,6) нг/мл ($p_1 < 0,000001$; $p_2 = 0,1$; $p_3 = 0,21$), что в 2 раза превышает данные здоровых добровольцев.

У подростков с обострением распространенной формы атопического дерматита в сыворотке крови уровень аутоантител к коллагену III типа превышает контрольные значения в 2 раза, составляя 76 (56,74-74,26) нг/мл ($p_1 < 0,00001$), что в 1,3 раза превосходит показатель при ограниченной форме заболевания. В ремиссию у подростков происходит снижение концентрации на 14,5% до 60,46 (51,79-72,145) нг/мл ($p_1 < 0,00001$; $p_2 = 0,0008$). У взрослых с распространенной формой заболевания уровень аутоантител к коллагену III типа в сыворотке крови равен 58,56 (45,88-69,1) нг/мл ($p_1 = 0,00001$; $p_3 = 0,001$), что в 1,8 раза больше показателя в контрольной группе и на 0,64 нг/мл меньше, чем при ограниченной форме заболевания. При регрессе клинических симптомов в группе взрослых уровень аутоантител снижается до 40,86 (34,54-58,33) нг/мл ($p_1 = 0,0097$; $p_2 = 0,07$; $p_3 < 0,00001$), что на 27% превышает контрольное значение и на 30% меньше, чем у взрослых с ограниченным кожным процессом.

Концентрация аутоантител к коллагену III типа в кожном экссудате, полученном методом «кожного окна», у подростков в контрольной группе составляет 38,01 (31,47-44,6) нг/мл, у взрослых — 44,66 (41,21-48,11) нг/мл. У подростков с ограниченным атопическим дерматитом в период обострения количество аутоантител снижается в 5,8 раза до 6,48 (6,05-7,25) нг/мл ($p_1 < 0,001$), у взрослых с аналогичной формой дерматоза уменьшается в 7 раз, составляя 6,34 (6,73-6,61) нг/мл ($p_1 < 0,001$; $p_3 = 0,2$). При распространенном кожном процессе у подростков в кожном экссудате уровень аутоантител равен 5,93 (4,89-6,32) нг/мл ($p_1 < 0,001$; $p_4 = 0,00084$), что в 6,4 раза меньше контрольного значения и на 8% ниже, чем при ограниченном процессе. У взрослых с распространенной формой дерматоза концентрация аутоантител к коллагену III типа составляет 7,44 (6,96-8,05) нг/мл ($p_1 < 0,001$; $p_3 = 0,0000001$; $p_4 = 0,002$), что в 6 раз меньше, чем у здоровых добровольцев и на 17% больше, чем при ограниченном кожном процессе.

Уровень аутоантител к коллагену III типа как у подростков, так и у взрослых выше в сыворотке крови. Так, у подростков с ограниченным атопическим дерматитом концентрация аутоантител к коллагену III типа в сыворотке крови больше в 8,2 раза, а при распространенном процессе — в 12 раз, чем в кожном экссудате. У взрослых при ограниченном кожном процессе концентрация аутоантител к коллагену III типа в сыворотке крови в 9,3 раза больше, чем в кожном экссудате, а при распространенной форме дерматоза — в 7,8 раза.

Обсуждение

Выявлено, что у пациентов с атопическим дерматитом концентрация аутоантител к коллагену I и III в сыворотке крови превышает показатели контрольной группы. Мы считаем, что аутоантитела у здоровых добровольцев быстро элиминируются и не вступают в патологические реакции.

Перманентно высокие концентрации аутоантител к коллагену I и III у пациентов с атопическим дерматитом, характеризуют их активное участие в формировании аутоиммунного звена патогенеза дерматоза. Мы считаем, что образование аутоантител к коллагену способствует формированию циркулирующих и преципитирующих иммунных комплексов, которые запускают процессы рекрутизации естественных киллеров, реализуя цитотоксический и иммунокомплексный типы аллергических реакций, что изменяет представление о механизме формирования атопического дерматита. Коллагеновые волокна дермы, являясь субстратом миграции иммунных клеток, способствуют не только пролонгированию иммунных реакций, но и гиперреактивности кожи даже в ремиссию дерматоза [7, 8, 12].

Заключение

Таким образом, выявленные аутоантитела к коллагену I и III типов в сыворотке крови и кожном экссудате при атопическом дерматите свидетельствуют о формировании аутоиммунных механизмов патогенеза дерматоза.

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. Варламов Е.Е., Елисютина О.Г., Виноградова Т.В., Феденко Е.С., Пампура А.Н. Патогенетические особенности цитокинового профиля у пациентов с атопическим дерматитом в зависимости от возраста // Российский аллергологический журнал, 2016. Т. 4, № 5. С. 37-42. [Varlamov E.E., Elisyutina O.G., Vinogradova T.V., Fedenko E.S., Pampura A.N. Pathogenetic features of the cytokine profile in patients with atopic dermatitis, depending on age. *Rossiyskiy allergologicheskiy zhurnal = Russian Allergology Journal*, 2016, Vol. 4, no. 5, pp. 37-42. (In Russ.)]
2. Варламов Е.Е., Пампура А.Н., Сухоруков В.С. Значение цитокинов в патогенезе атопического дерматита // Российский вестник перинатологии и педиатрии, 2018. Т. 63, № 1. С. 28-33. [Varlamov E.E., Pampura A.N., Sukhorukov V.S. The importance of cytokines in the pathogenesis of atopic dermatitis. *Rossiyskiy vestnik perinatologii i pediatrii = Russian Bulletin of Perinatology and Pediatrics*, 2018, Vol. 63, no.1, pp. 28-33. (In Russ.)]
3. Ермаков Е.А., Климов В.В. Анализ содержания цитокинов при атопическом 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.)]
4. Касохов Т.Б., Цораева З.А., Касохова В.В., Мазур А.И. Атопический дерматит у детей // Медицинские науки, 2016. № 1. С. 8-26. [Kasokhov T.B., Coraeva Z.A., Kasokhova V.V., Mazur A.I. Atopic dermatitis in children. *Meditinskii nauki = Medical Sciences*, 2016, no. 1, pp. 8-26. (In Russ.)]
5. Кибалина И.В., Цыбиков Н.Н. Роль эндотелина-1 и аутоантител к нему в патогенезе атопического 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.)]
6. Кубанов А.А., Намазова-Баранова Л.С., Хаитов Р.М., Ильина Н.И., Алексеева Е.А., Амбарчян Э.Т., Артемьева С.И., Аршинский М.И., Астафьева Н.Г., Вишнева Е.А., Волнухин В.А., Данилычева И.В., Елисютина О.Г., Епишев Р.В., Жестков А.В., Жилова Ж.Б., Жукова О.В., Заславский Д.В., Знаменская Л.Ф., Карамова А.Э., Короткий Н.Г., Кохан М.М., Круглова Л.С., Кунгуров Н.В., Левина Ю.Г., Львов А.Н., Материкин А.И., Мишина О.С., Монахов К.Н., Мурашкин Н.Н., Ненашева Н.М., Пампура А.Н., Плахова К.И., Потеев Н.Н., Притуло О.А., Разнатовский К.И., Сапунцова С.Г., Селимзянова Л.Р., Скороходкина О.В., Феденко Е.С., Фомина Д.С., Фриго Н.В., Фролова З.В., Хаитов М.Р., Чикин В.В. Атопический дерматит // Российский аллергологический журнал, 2021. Т. 18, № 3. С. 44-92. [Kubanov A.A., Namazova-Baranova L.S., Khaitov R.M., Ilyina N.I., Alekseeva E.A., Ambarchyan E.T., Artemyeva S.I., Arshinsky M.I., Astafyeva N.G., Vishneva E.A., Volnukhin V.A., Danilycheva I.V., Elisyutina O.G., Epishev R.V., Zhestkov A.V., Zhilova Zh.B., Zhukova O.V., Zaslavsky D.V., Znamenskaya L.F., Karamova A.E., Korotky N.G., Kohan M.M., Kruglova L.S., Kungurov N.V., Levina Y.G., Lvov A.N., Materikin A.I., Mishina O.S., Monakhov K.N., Murashkin N.N., Nenasheva N.M., Pampura A.N., Plakhova K.I., Potekaev N.N., Pritulo O.A., Raznatovsky K.I., Sapuntsova S.G., Selimzyanova L.R., Skorokhodkina O.V., Fedenko E.S., Fomina D.S., Frigo N.V., Frolova Z.V., Khaitov M.R., Chikin V.V. Atopic dermatitis. *Rossiyskiy allergologicheskiy zhurnal = Russian Allergology Journal*, 2021, Vol. 18, no. 3, pp. 44-92. (In Russ.)]
7. Потехина Ю.П. Структура и функции коллагена // Российский остеопатический журнал, 2016. Т. 32, № 1. С. 87-99. [Potekhina Yu.P. The structure and functions of collagen. *Rossiyskiy osteopaticheskiy zhurnal = Russian Osteopathic Journal*, 2016, Vol. 32, no. 1, pp. 87-99. (In Russ.)]
8. Шаповалова Е.Ю., Бойко Т.А., Барановский Ю.Г., Каракулькина О.А., Барановский А.Г. Оптимизация типа коллагена каркаса в биоинженерных конструкциях для заживления язв кожи с учетом эмбриогенеза кожи у эмбрионов человека // Вестник Уральской медицинской академической науки, 2014. № 5. С. 107-109. [Shapovalova E.Yu., Boyko T.A., Baranovsky Yu.G., Karakulkina O.A., Baranovsky A.G. Optimization of the type of collagen framework in engineering structures for the healing of skin ulcers, taking into account the embryogenesis of the skin in human embryos. *Vestnik Uralskoy meditsinskoy akademicheskoy nauki = Journal of Ural Medical Academic Science*, 2014, no. 5, pp. 107-109. (In Russ.)]

9. Furue M., Chiba T., Tsuji G., Ulzii D., Kido-Nakahara M., Nakahara T., Radono T. Atopic dermatitis: immune deviation, barrier dysfunction, IgE autoreactivity and new therapies. *Allergol. Int.*, 2017, Vol. 66, no. 3, pp. 398-403.
10. Sanjuan M.A., Sagar D., Kolbeck R. Role of IgE in autoimmunity. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2016, Vol. 137, no. 6, pp. 1651-1661.
11. Simon D., Aerberhard C., Erdemoglu Y., Simon X. Th17 cells and tissue remodeling in atopic and contact dermatitis. *Eur. J. Allergy Clin. Immunol.*, 2014, Vol. 69, no. 1, pp. 125-131.
12. 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.

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

Котенко А.В. — студентка лечебного факультета 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

Kotenko A.V., Student, Faculty of Medicine, Chita State Medical Academy, Chita, Russian Federation

Поступила 24.01.2022
Принята к печати 13.02.2022

Received 24.01.2022
Accepted 13.02.2022

РОЛЬ ГЕНОВ ЦИТОКИНОВ И TOLL-ПОДОБНЫХ РЕЦЕПТОРОВ В ПАТОГЕНЕЗЕ ВРОЖДЕННЫХ ПОРОКОВ СЕРДЦА

Шабалдин А.В., Синицкая А.В., Шмелевич С.А.

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

Резюме. Врожденные пороки сердца (ВПС) могут быть последствием иммунных нарушений в системе «мать — эмбрион» и/или конституциональных нарушений в регуляторных системах, в том числе связанных с Toll-like рецепторами (TLR), цитокинами и их рецепторами. Исходя из этого, целью исследования было изучение ассоциации между генами цитокинов и TLR с врожденными пороками сердца у детей.

Обследовано 188 детей с врожденными пороками сердца (основная группа). Выделены отдельные группы ВПС: септальные ВПС — 98 детей, пороки клапанов сердца — 17 детей, тетрада Фалло — 15 детей, коарктация аорты — 10 детей, фетальные дренажи — 32 ребенка, единый желудочек сердца — 9 детей и аномальные дренажи легочных вен — 7 детей. Контрольная группа была сформирована из 103 здоровых детей, сопоставимых с основной группой по возрасту и полу. Отобрано пять генов цитокинов и их рецепторов (*IL6* rs1800796, *IL6* rs2069827, *IL6R* rs2228145, *IL6R* rs2229238, *IL8* rs4073, *IL10* rs1800871, *IL10* rs1800896, *IL10* rs1800872, *TNF* rs1800629, *TNF* rs361525, *TNF* rs1799964), четыре гена Toll-like рецепторов (*TLR*: *TLR1* rs5743611, *TLR1* rs5743551, *TLR2* rs5743708, *TLR2* rs3804099, *TLR4* rs4986791, *TLR4* rs4986790, *TLR6* rs3775073, *TLR6* rs5743810). Использованы базы данных dbSNP, SNPinfo, SNPnexus. Основным методом статистического анализа была пошаговая логистическая регрессия.

Исследование показало, что детерминирование врожденных пороков сердца связано с генами иммунной регуляции. В частности, особое значение имеет миссен-мутация *TLR6* rs5743810, которая была предиктором врожденных пороков клапанов сердца. Формирование врожденных пороков клапанов сердца и коарктации аорты детерминировано межгенными взаимодействиями *TLR2* rs5743708 с *TLR6* rs5743810 и *TLR2* rs5743708 с *TLR6* rs3775073 соответственно. Для врожденных пороков клапанов сердца такими полиморфными участками генов были *IL6* rs2069827, *IL6R* rs2229238 и *IL8* rs4073, а для коарктации аорты — *IL6R* rs2228145, *IL8* rs4073. Формирование септальных врожденных пороков сердца связано с общим вкладом в детерминирование данной патологии полиморфных вариантов генов *TLR* и цитокинов. Сочетанное влияние на этот процесс имеют миссенс-мутация в гене *TLR4* rs4986790 и мутация *TNF* rs1799964, приводящая к повышенному синтезу молекулы *TNFα*. Вклад взаимодействия генов *TLR* и цитокинов в формирование ВПС в целом незначителен.

Ключевые слова: врожденные пороки сердца, гены *TLR*, *IL*, *TNF*

Адрес для переписки:

Шабалдин Андрей Владимирович
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний»
650002, Россия, г. Кемерово, Сосновый б-р, 6.
Тел.: 8 (3842) 64-46-50.
E-mail: weit2007@yandex.ru

Address for correspondence:

Shabaldin Andrey V.
Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular
Diseases
650002, Russian Federation, Kemerovo, Sosnovy blvd, 6.
Phone: 7 (3842) 64-46-50.
E-mail: weit2007@yandex.ru

Образец цитирования:

А.В. Шабалдин, А.В. Синицкая, С.А. Шмелевич
«Роль генов цитокинов и Toll-подобных рецепторов
в патогенезе врожденных пороков сердца» // *Медицинская иммунология*, 2022. Т. 24, № 3. С. 605-616.
doi: 10.15789/1563-0625-ROC-2488
© Шабалдин А.В. и соавт., 2022

For citation:

A.V. Shabaldin, A.V. Sinitskaya, S.A. Shmulevich "Role of
cytokine and Toll-like receptor genes in pathogenesis of inborn
heart disease", *Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya
Immunologiya*, 2022, Vol. 24, no. 3, pp. 605-616.
doi: 10.15789/1563-0625-ROC-2488
DOI: 10.15789/1563-0625-ROC-2488

ROLE OF CYTOKINE AND TOLL-LIKE RECEPTOR GENES IN PATHOGENESIS OF INBORN HEART DISEASE

Shabaldin A.V., Sinitskaya A.V., Shmulevich S.A.

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

Abstract. Sporadic congenital heart disease (CHD) may result from immune disorders in the mother – embryo system and/or constitutional disorders in regulatory systems, including those associated with TLR receptors, cytokines and their receptors. The aim of our study was to investigate associations between cytokine and TLR genes and sporadic congenital heart disease in children.

In the main group, 188 children with sporadic (without family history) congenital heart defects were examined. Separate groups of CHD were identified: septal CHD – 98 children; valvular heart disease – 17 children; Fallot tetralogy – 15 children; aorta coarctation – 10 children; fetal drains – 32 children; single ventricle affection – 9 children, and anomalous drainage of *v. pulmonalis* was diagnosed in 7 children. The control group included 103 age- and sex-matched healthy children. We have determined gene polymorphisms of five genes encoding cytokines and their receptors (*IL6* rs1800796, *IL6* rs2069827, *IL6R* rs2228145, *IL6R* rs2229238, *IL8* rs4073, *IL10* rs1800871, *IL10* rs1800896, *IL10* rs1800872, *TNF* rs1800629, *TNF* rs361525, *TNF* rs1799964), four genes Toll-like receptors (*TLR*: *TLR1* rs5743611, *TLR1* rs5743551, *TLR2* rs5743708, *TLR2* rs3804099, *TLR4* rs4986791, *TLR4* rs4986790, *TLR6* rs3775073, *TLR6* rs5743810). The dbSNP, SNPinfo, SNPnexus databases were used to select and design test systems. Stepwise logistic regression was the main method of statistical analysis.

Clinical diagnosis of congenital heart defects is associated with immune regulatory genes. In particular, the missense mutation *TLR6* rs5743810, which was a predictor of congenital valvular heart disease, is of particular importance. Development of congenital heart valve defects and aortic coarctation is associated with intergenic interactions of *TLR2* rs5743708 with *TLR6* rs5743810, and *TLR2* rs5743708 with *TLR6* rs3775073, respectively. For congenital heart valve defects, such polymorphic regions are as follows: *IL6* rs2069827, *IL6R* rs2229238, and *IL8* rs4073, for aortic coarctation – *IL6R* rs2228145, *IL8* rs4073. Development of septal congenital heart defects is associated with general contribution of polymorphic variants of the *TLR* genes and cytokines to this pathology. A missense mutation of the *TLR4* rs4986790 gene and a *TNF* rs1799964 mutation leading to increased synthesis of the *TNF* α molecule, may have a combined effect on this process. In general, contribution of TLR and cytokine genes interactions to the CHD development seems to be not significant.

Keywords: congenital heart diseases, *TLR*, *IL*, *TNF*, gene polymorphisms

Введение

Врожденные пороки сердца (ВПС) являются ведущей нозологией в структуре врожденных пороков и аномалий развития плода [8]. В некоторых регионах России и мира их удельный вес превышает 50% [2]. Особое значение имеет то, что ВПС определяют уровень перинатальной и младенческой смертности в мире, и хирургическое лечение данной патологии может не приводить к полному выздоровлению ребенка [22].

Проблемы, связанные с изучением этиологии и патогенеза ВПС, прежде всего, определяют большой группой отдельных нозологических форм в структуре врожденных пороков и аномалий сердечно-сосудистой системы. В эту группу пороков входят как функционирующие после рождения фетальные дренажи, так и критические ВПС. Хирургическую коррекцию последних необходимо проводить в первые сутки после рождения ребенка. ВПС могут иметь семейную

историю, часть из них можно отнести моногенным заболеваниям, в этиологии которых лежит наследуемая миссенс-мутация, передающаяся из поколения в поколение. Эту группу семейных ВПС активно изучают во всем мире, и значимые мутации, определяющие риск формирования ВПС, описаны в литературе [9, 13].

Другая группа ВПС, отдельно учитываемая в мировых регистрах ВПС, связана с хромосомными заболеваниями, такими как болезнь Дауна, синдром Шершевского–Тернера и другими. Кроме того, существует группа ВПС, при которых обнаруживаются хромосомные транслокации с мало проявленными фенотипическими признаками. Этиология и патогенез этой группы ВПС также активно изучается [11].

В то же время более 80% из всех ВПС приходится на спорадические (без семейной истории) ВПС не связанных с хромосомными заболеваниями/синдромами и с хромосомными транслокациями [4]. Полиморфизм отдельных нозологий

ВПС в этой группе достигает максимума (более 140 отдельных форм). Изучение генетических, социальных, семейных, экологических факторов, ассоциированных с формированием этой группы ВПС в целом и отдельных нозологий в частности, показало, что спорадические ВПС без хромосомных нарушений являются преимущественно мультифакторными заболеваниями. В основе этиологии и патогенеза этих заболеваний лежит взаимовлияние факторов, экзогенного и эндогенного происхождения. С позиции эмбрионального развития в целом и сердечно-сосудистой системы в частности это взаимодействие связано с такими экзогенными, социальными и медицинскими факторами, как экологические поллютанты, курение, алкоголь, инфекционные агенты и прочие; с конституционально обусловленной — иммунохимической активностью в системе «мать — плод» и иммунными гиперреактивностями. Согласно концепции И.Е. Ковалева гомеостаз на всех этапах онтогенеза поддерживается функциональной иммунохимической системой, включающей метаболизм эндо и ксенобиотиков с последующим иммунным ответом на их активные метаболиты [10]. Известные гиперреактивности иммунной системы (по атопическому, цитотоксическому, иммунокомплексному, CD4-ассоциированному и рецепторному типам) могут лежать в основе декомпенсации воспаления в системе «мать — плод», индуцированного как аллоантигенами зародыша, так и эндо и ксенобиотиками.

Исследования роли иммунных нарушений в системе «мать — эмбрион» в детерминировании ВПС были представлены ранее [5]. Изучение особенностей детерминирования иммунных гиперреактивностей, как звена патогенеза ВПС, также началось [21]. В то же время детерминирование иммунной гиперреактивности в системе «мать — плод» может быть связано с одонуклеотидными заменами в генах сигнальных паттернов распознающих рецепторов, а также мессенджеров воспалительного процесса (цитокины, хемокины и другие). С этих позиций представляет интерес не столько поиск отдельных ассоциации между полиморфными участками генов цитокинов и сигнальных паттернов распознающих рецепторов с ВПС, сколько выявление связей между межгенными взаимодействиями, с одной стороны, и ВПС — с другой.

Необходимо отметить, что постулируемый воспалительный процесс в сердечно-сосудистой системе, как основы иммунного звена патогенеза ВПС, может сохраняться в раннем постнатальном периоде за счет генетического детерминирования. Именно этот период, а в дальнейшем — и пренатальный, является временем для максимального

количества хирургических коррекций и лечений ВПС, в том числе с применением различных имплантов биологического и технологического происхождения. Конституционально обусловленная гиперреактивность иммунной системы плода и новорожденного ребенка может быть основой операционных, ранних и отдаленных осложнений. Это требует отдельного изучения.

Исходя из этого, была поставлена **цель исследования** — изучить ассоциации между генами цитокинов и сигнальных паттернов распознающих рецепторов с одной стороны и ВПС у детей с другой.

Материалы и методы

Для выполнения поставленной цели обследовано 188 детей (103 девочки и 85 мальчиков) с ВПС (основная группа), сформированная на базе детского кардиологического отделения ГБУЗ Кузбасский клинический кардиологический диспансер имени академика Л.С. Барбараша. Диагноз «ВПС» у детей подтвержден с помощью ЭхоКГ и других инструментальных методов. Структура ВПС представлена в таблице 1.

Контрольная группа была сформирована из 103 здоровых детей (52 девочки и 51 мальчик). Группа была сформирована на клинических базах ГБОУ ВО Кемеровского государственного медицинского университета. Все участники исследования подписывали информированное согласие на участие. Средний возраст детей основной группы — $3,9 \pm 2,3$, контрольной — $4,7 \pm 1,8$.

Сбор крови проводили из локтевой вены в пробирку, содержащую K_3 ЭДТА. Выделение ДНК проводили стандартной фенол-хлороформной экстракцией согласно протоколу. Качество и количество выделенной ДНК измеряли на спектрофотометре NanoDrop ND-2000C (ThermoFisher, США).

Генотипирование проводили методом ПЦР в режиме реального времени на амплификаторе Viia7 (Applied Biosystems, США) с использованием Taqman зондов. Для исследования выбрано пять генов цитокинов и их рецепторов (*IL6* rs1800796, *IL6* rs2069827, *IL6R* rs2228145, *IL6R* rs2229238, *IL8* rs4073, *IL10* rs1800871, *IL10* rs1800896, *IL10* rs1800872, *TNF* rs1800629, *TNF* rs361525, *TNF* rs1799964), четыре гена Toll-like рецепторов (*TLR*: *TLR1* rs5743611, *TLR1* rs5743551, *TLR2* rs5743708, *TLR2* rs3804099, *TLR4* rs4986791, *TLR4* rs4986790, *TLR6* rs3775073, *TLR6* rs5743810). Для отбора полиморфизмов использовались базы данных dbSNP, SNPinfo, SNPnexus.

Статистическая обработка данных проводилась с использованием программ Statistica 10.0 и MedCalc 17.5.3. Анализ соблюдения закона Харди—Вайнберга проводили при помощи про-

ТАБЛИЦА 1. НОЗОЛОГИЧЕСКИЕ ФОРМЫ СПОРАДИЧЕСКИХ ВРОЖДЕННЫХ ПОРОКОВ СЕРДЦА У ДЕТЕЙ ОСНОВНОЙ ГРУППЫ

TABLE 1. NOSOLOGICAL FORMS OF SPORADIC CONGENITAL HEART DEFECTS IN CHILDREN OF THE MAIN GROUP

Нозология Nosology	Абс. (%) Abs. (%)	В группе, абс. (%) In group, abs. (%)
Септальные пороки сердца Septal heart defects		
Дефект межжелудочковой перегородки (ДМЖП) Ventricular septal defect (VSD)	28 (14,89)	98 (52,13)
Дефект межпредсердной перегородки (ДМПП) Atrial septal defect (ASD)	64 (34,04)	
ДМЖП и ДМПП VSD + ASD	6 (3,19)	
Пороки клапанов сердца Valvular heart disease		
Стеноз аортального клапана Aortic valve stenosis	5 (2,66)	17 (9,04)
Двустворчатый атриовентрикулярный клапан Bicuspid atrioventricular valve	3 (1,60)	
Стеноз клапана легочной артерии Pulmonary valve stenosis	8 (4,26)	
Дисплазия трикуспидального клапана Tricuspid valve dysplasia	1 (0,53)	
Отдельные нозологии Separate nosologies		
Тетрада Фалло Tetralogy of Fallot	15 (7,98)	15 (7,98)
Единый желудочек сердца Single ventricle heart defects	9 (4,79)	9 (4,79)
Коарктация аорты Coarctation of the aorta	10 (5,32)	10 (5,32)
Открытый артериальный проток Patent ductus arteriosus	32 (17,02)	32 (17,02)
Тотальный anomальный дренаж легочных вен Total anomalous pulmonary venous return	3 (1,60)	3 (1,60)
Частичный anomальный дренаж легочных вен Partial anomalous pulmonary venous drainage	4 (2,13)	4 (2,13)

граммы SNPstats. Для поиска сочетанных предикторов ВПС в генах цитокинов и сигнальных паттерн распознающих рецепторов была использована логистическая пошаговая регрессия (статистический метод классификации с использованием линейного дискриминанта Фишера). Зависимой переменной были случаи отсутствия (0 баллов) или наличия (1 балл) ВПС, а независимыми – баллы, присвоенные генотипам исследуемых полиморфных сайтов генов цитокинов,

их рецепторов, а также сигнальных паттернов распознающих рецепторов. Так, гомозиготный минорный генотип имел 3 балла, гетерозиготный генотип – 2 балла и гомозиготный мажорный генотип – 1 балл. Т. е. чем реже встречается генотип, тем выше его балл. Коэффициенты, полученные для выявленных значимых предикторов, указывали на степень ассоциации генотипа с ВПС. Знак (- или +) перед переменной указывает на положительную или отрицательную связь.

Положительная связь показывала, что генотип является предиктором ВПС; а отрицательная — на ее протективность. В то же время полученная при этом анализе логистическая функция с весовыми коэффициентами для каждого предиктора отражает взаимодействие и интегральное влияние сочетанных генотипов в реализации эффекта. Эффективность логистической функции оценивалась по показателю площади под кривой (AUC) из ROC-анализа ставшего, фактически, стандартом для оценки качества бинарной классификации. Поиск логистических функций выполнен как для ВПС в целом, так и для отдельных групп (септальные ВПС, пороки клапанов сердца) и нозологий. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$ [3].

Результаты

Распределение всех частот генотипов в основной и контрольной группах соответствовало распределению Харди—Вайнберга.

Логистическая регрессия для зависимого фактора наличие или отсутствие ВПС без разделения их на отдельные нозологии показала наличие значимой отрицательной ассоциации между бинарным зависимым фактором и полиморфным вариантом гена *TLR2* rs5743708 (табл. 2). Кроме того, свободный член логистической регрессии, сдвигая оси координат, усиливает логистическую функцию и значимо увеличивает суммарное влияние независимых переменных на бинарный показатель. В данном случае, вполне вероятно, что совместное влияние генотипов *TLR2* rs5743708, *TLR1* rs5743551, *IL6R* rs2229238, *TNF* rs1799964 и *IL6* rs2069827 могут детерминировать ВПС без

разделения их на нозологии. Для проверки этого предположения проведен ROC-анализ, в котором была оценена эффективность логистической функции, результаты представлены на рисунке 1.

Как видно из рисунка 1, полученная площадь под кривой (показатель AUC) значимо не отличалась от равновероятного распределения ($p = 0,227$). Таким образом, можно сделать вывод, что влияние исследуемых полиморфных вариантов генов, при совместном их эффекте, существенно не влияет на формирование ВПС без разделения их на нозологии.

По аналогии был проведен математический анализ для септальных ВПС, для пороков клапанов сердца, для отдельных нозологических форм, в том числе для пороков, связанных с фетальными дренажами (ОАП).

Значимых предикторов и эффективности логистической функции не получено для следующих нозологических форм: тетрада Фалло, открытый артериальный проток, единый желудочек сердца, аномальный дренаж легочных вен. Соответственно, данные пороки с малой долей вероятности детерминируются генами цитокинов и сигнальных паттернов распознающих рецепторов. В то же время для врожденных пороков клапанов сердца были выявлены ассоциации с полиморфными вариантами генов цитокинов и Toll-like рецепторов (табл. 3).

Как видно из таблицы 3, положительно ассоциированными с формированием клапанных врожденных пороков сердца были полиморфные варианты генов *TLR6* rs5743810 и *IL6* rs2069827. В данном случае минорные (мутантные) генотипы данных полиморфизмов могут детерминировать

ТАБЛИЦА 2. РЕЗУЛЬТАТЫ ЛИНЕЙНОЙ ЛОГИСТИЧЕСКОЙ РЕГРЕССИИ ДЛЯ ЗАВИСИМОГО ФАКТОРА – ВРОЖДЕННЫЕ ПОРОКИ СЕРДЦА БЕЗ РАЗДЕЛЕНИЯ НА НОЗОЛОГИЧЕСКИЕ ФОРМЫ

TABLE 2. RESULTS OF LINEAR LOGISTIC REGRESSION FOR THE DEPENDENT FACTOR – CONGENITAL HEART DEFECTS WITHOUT DIVISION INTO NOSOLOGICAL FORMS

Аналиты Analytes	β	Стандартная ошибка β Standard Error β	B	Стандартная ошибка B Standard Error B	p-level
Свободный член логистической регрессии Free term of logistic regression			0,709	0,180	0,000*
<i>TLR2</i> rs5743708	-0,118	0,059	-0,190	0,094	0,044*
<i>TLR1</i> rs5743551	-0,081	0,058	-0,064	0,046	0,165
<i>IL6R</i> rs2229238	0,070	0,059	0,054	0,045	0,234
<i>TNF</i> rs1799964	0,065	0,058	0,054	0,049	0,270
<i>IL6</i> rs2069827	0,060	0,058	0,072	0,070	0,305

Примечание. * – значимые различия, $p < 0,05$.

Note. *, significant differences, $p < 0.05$

ТАБЛИЦА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ЛИНЕЙНОЙ ЛОГИСТИЧЕСКОЙ РЕГРЕССИИ ДЛЯ ЗАВИСИМОГО ФАКТОРА – ВРОЖДЕННЫЕ ПОРОКИ КЛАПАНОВ СЕРДЦА БЕЗ РАЗДЕЛЕНИЯ НА НОЗОЛОГИЧЕСКИЕ ФОРМЫ

TABLE 3. RESULTS OF LINEAR LOGISTIC REGRESSION FOR THE DEPENDENT FACTOR – CONGENITAL HEART DEFECTS WITHOUT DIVISION INTO NOSOLOGICAL FORMS

Аналиты Analytes	β	Стандартная ошибка β Standard Error β	B	Стандартная ошибка B Standard Error B	p-level
Свободный член логистической регрессии Free term of logistic regression			-0,175	0,242	0,471
TLR6 rs5743810	0,229	0,085	0,128	0,047	0,008*
IL6 rs2069827	0,250	0,084	0,235	0,079	0,004*
TLR2 rs5743708	-0,142	0,084	-0,177	0,105	0,094
IL6R rs2229238	0,134	0,085	0,090	0,057	0,119
TNF rs361525	-0,117	0,084	-0,162	0,118	0,170
IL8 rs4073	0,108	0,085	0,059	0,047	0,208

Примечание. * – значимые различия, $p < 0,05$.

Note. *, significant differences, $p < 0.05$

ТАБЛИЦА 4. РЕЗУЛЬТАТЫ ЛИНЕЙНОЙ ЛОГИСТИЧЕСКОЙ РЕГРЕССИИ ДЛЯ ЗАВИСИМОГО ФАКТОРА – КОАРКТАЦИЯ АОРТЫ

TABLE 4. RESULTS OF LINEAR LOGISTIC REGRESSION FOR THE DEPENDENT FACTOR – COARCTATION OF THE AORTA

Аналиты Analytes	β	Стандартная ошибка β Standard Error β	B	Стандартная ошибка B Standard Error B	p-level
Свободный член логистической регрессии Free term of logistic regression			-0,079	0,163	0,627
IL6R rs2228145	0,251	0,091	0,102	0,037	0,007*
IL10 rs1800896	-0,180	0,090	-0,078	0,039	0,049*
TLR2 rs5743708	0,143	0,089	0,107	0,067	0,112
TLR6 rs3775073	-0,122	0,090	-0,048	0,035	0,177
IL8 rs4073	0,111	0,090	0,046	0,037	0,218

Примечание. * – значимые различия, $p < 0,05$.

Note. *, significant differences, $p < 0.05$.

формирование врожденных пороков клапанов сердца.

Полиморфный вариант *IL6* rs2069827 находится за пределами основной транскрибируемой последовательности, поэтому он не влияет на структуру молекулы, но может оказывать влияние на скорость включения гена. Соответственно, мутантный вариант гена будет влиять на экспрессию молекулы IL-6 и через этот механизм могут формироваться нарушения сигнальных путей, ассоциированных с данным цитокином. Логистическая пошаговая регрессия также по-

казала, что в логистической функции могут участвовать и другие гены, такие как *TLR2* rs5743708, *IL6R* rs2229238, *TNF* rs361525 и *IL8* rs4073. Для оценки эффективности логистической функции проведен ROC-анализ, результат которого представлен на рисунке 2.

Как видно из рисунка 2, уравнение для логистической функции, составленное с учетом всех полученных предикторов и протекторов, и их весовых коэффициентов, значительно отличается от полученную кривую, ограничивающую AUC, от равновероятной прямой и 50% площадью под ней.

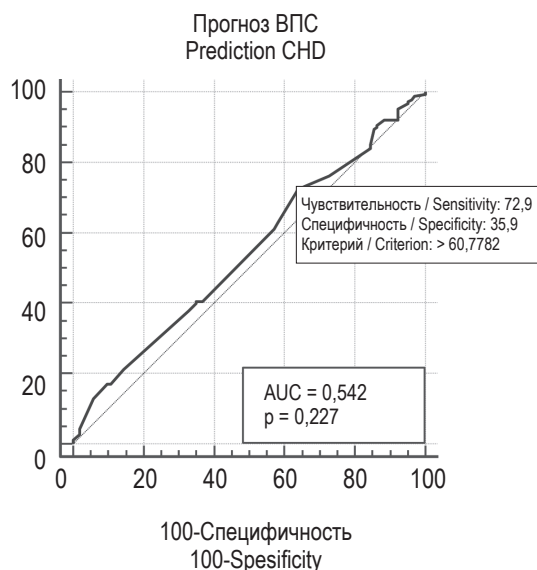


Рисунок 1. ROC-анализ определения эффективности логистической функции для ВПС без разделения на отдельные нозологии по показателю AUC

Figure 1. ROC-analysis of logistic function efficiency for CHD not differentiated into nosologies by AUC

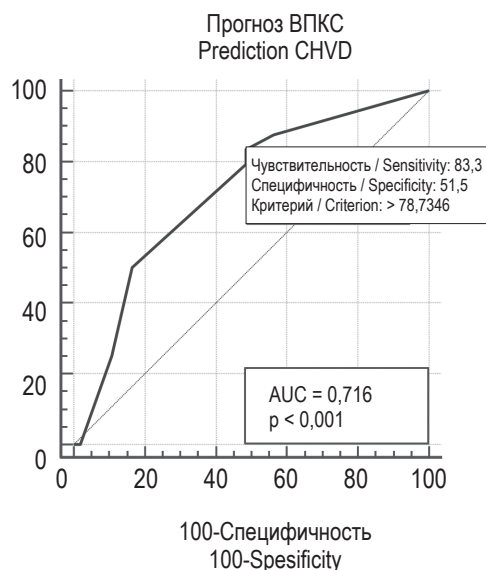


Рисунок 2. ROC-анализ определения эффективности логистической функции для врожденных пороков клапанов сердца (ВПКС) по показателю AUC

Figure 2. ROC-analysis of logistic function efficiency for congenital heart valve diseases (CHVD) by AUC

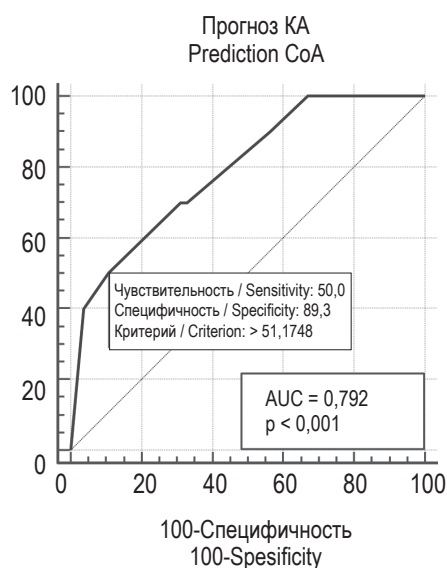


Рисунок 3. ROC-анализ определения эффективности логистической функции для коарктации аорты (КА) по показателю AUC

Figure 3. ROC-analysis of logistic function efficiency for coarctation of the aorta by AUC

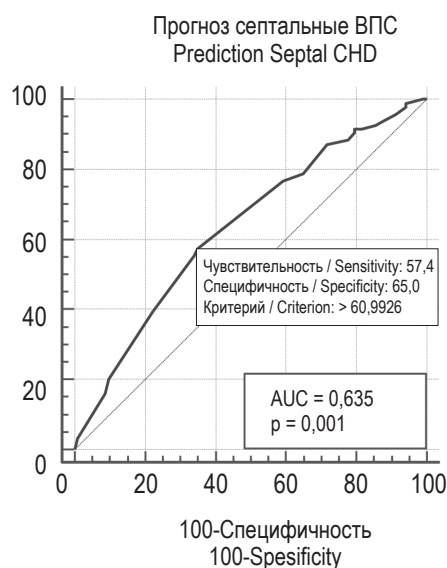


Рисунок 4. ROC-анализ определения эффективности логистической функции для септальных ВПС без разделения на отдельные нозологии по показателю AUC

Figure 4. ROC-analysis of logistic function efficiency for septal CHD not differentiated into nosologies by AUC

Таким образом, формирование врожденных пороков клапанов сердца имеет свои значимые генетические маркеры как в генах сигнальных паттернов распознающих рецепторов, так и цитокинов (*TLR6* rs5743810 и *IL6* rs2069827). Формирование данной группы пороков сердца также детерминировано сочетанным влиянием пяти

из исследованных генов (*TLR2* rs5743708, *IL6R* rs2229238, *TNF* rs361525 и *IL8* rs4073). Одной из схожих с пороками клапанов сердца по патогенезу является коарктация аорты, где формирование сужения может быть исходом пролиферативного компонента воспаления. Исследования этой группы пороков сердца показало следующие ре-

зультаты, представленные в таблице 4 и на рисунке 3.

Из таблицы 4 видно, что предиктором коарктации аорты является минорный генотип *IL6R* rs2228145, а протектором минорный (мутантный) генотип *IL10* rs1800896. С учетом данных NCBI, *IL6R* rs2228145 кодирует миссенс-мутацию, определяющую замену аспарагина (Asp) в 358 положении на аланин (Ala). Это точечная замена может влиять на структуру молекулы рецептора к IL-6 и через этот механизм ограничивать регуляторное влияние лиганда. Соответственно *IL10* rs1800896 является участком гена, находящегося за пределами основной транскрибируемой последовательности, и поэтому его детерминирующее влияние может быть только через особенности экспрессии молекулы IL-10. В то же время IL-10 является одной из значимых молекул, регулирующих воспаления и ассоциированный с ним пироптоз. В то же время в логистическую функцию входят и другие полиморфные варианты гена со своими весовыми коэффициентами. Оценка эффективности этой функции была проведена с помощью ROC-анализа (рис. 3).

ROC-анализ продемонстрировал значимое отклонение полученной кривой и площади под ней от равновероятной прямой и ограниченной ей площади. Это доказывает, что формирование коарктации аорты детерминируется, по меньшей мере, пятью генами цитокинов и сигнальных паттерн-распознающих рецепторов (*IL6R* rs2228145, *IL10* rs1800896, *TLR2* rs5743708, *TLR6* rs3775073 и *IL8* rs4073).

Исследования ассоциаций септальных ВПС без разделения по отдельным нозологиям с генами цитокинов Toll-like рецепторов показало отсутствие значимых предикторов и наличие протекторных минорных (мутантных) генотипов только в генах сигнальных паттерн-распознающих рецепторов (*TLR2* rs5743708, *TLR4* rs4986790 и *TLR6* rs3775073). Данные представлены в таблице 5. В данной логистической функции свободный член логистической регрессии значительно усиливает суммарные межгенные связи на бинарный показатель. Исходя из этого, можно предположить, что совместное влияние генотипов *TLR2* rs5743708, *IL6R* rs2228145, *TLR4* rs4986790, *TLR4* rs4986791, *TLR6* rs3775073, *TLR1* rs5743551, *TNF* rs1799964, *TLR2* rs3804099 и *TNF* rs361525 могут детерминировать септальные ВПС без разделения их на нозологии.

Для проверки этой гипотезы выполнен ROC-анализ, результаты которого представлены на рисунке 4.

Как видно из рисунка 4, полученная площадь под кривой (показатель AUC) значительно отличалась от равновероятного распределения

($p = 0,001$). Таким образом, можно сделать вывод, что влияние исследуемых полиморфных вариантов генов, при совместном их эффекте, значимо влияет на формирование септальных ВПС без разделения их на нозологии.

Обсуждение

В проведенном исследовании решалась важная задача по оценке роли детерминирования иммуновоспалительного звена патогенеза врожденных пороков сердца. В частности, высказана гипотеза о конституциональной предрасположенности к нарушениям регуляции процессов пролиферации и дифференцировки прогениторных клеток сердечно-сосудистой системы. Важными молекулярными элементами регуляторных сетей являются цитокины и их рецепторы, а также сигнальные паттерн-распознающие рецепторы. Все эти молекулы обладают преиотропностью, в том числе реализуют эффекты регуляции деления клеток, вступление их в дифференцировку и далее в запрограммированную смерть. Особым путем, ассоциированным с провоспалительными цитокинами, является пироптоз — запрограммированная смерть клетки за счет активации рецепторов апоптоза цитокиновыми лигандами [20].

С этих позиций значимые результаты получены для врожденных пороков клапанов сердца и для коарктации аорты. В частности, для группы врожденных пороков клапанов сердца была получена ассоциация с минорными (мутантными) генотипами двух полиморфных участков гена *TLR6* и *IL6*. Причем *TLR6* rs5743810 детерминирует миссенс мутацию, а следовательно, и функцию рецепторной молекулы. Согласно базе данных dbSNP, для данного полиморфизма не выявлено ассоциированных клинических вариантов. В то же время достаточно большое количество исследований показало ассоциации этого полиморфного участка гена с провоспалительными, инфекционными, онкологическими заболеваниями, а также атеросклерозом [6, 12, 19].

Известно, *TLR6* образует гетеродимеры с *TLR1* или с *TLR2*, через которые воспринимаются сигналы от различных лигандов, в том числе от патоген-ассоциированных молекулярных паттернов, и активируются внутриклеточные каскады, передающие сигналы на нуклеарный фактор транскрипции κB (NF- κB). Если в отношении эмбриобласта нет данных об особенностях экспрессии *TLR*, то новыми исследованиями транскриптома эндометрия у женщин с повторяющимися репродуктивными потерями после экстракорпорального оплодотворения было показано доминирование провоспалительных регуляторных сетей [16]. Авторы делают выводы, что репродуктивные потери связаны с высоким

провоспалительным потенциалом эндометрия и значимой по отношению к контролю (эндометрию здоровых женщин) экспрессией IL-6, интерферона гамма, IL-17A, IL-23A, интерферонов альфа и бета, IL-2, TLR4 и TLR6, а также ряда хемокинов и внутриклеточных мессенджеров (STAT3, RAG1). Ранее проведенные исследования показали схожесть иммунных нарушений в системе «мать — эмбрион/плод» при репродуктивных потерях и при врожденных пороках сердца у плода/новорожденного [4]. Таким образом, можно говорить о том, что неэффективно регулируемый провоспалительный потенциал имеет место не только со стороны материнского микроокружения, но и со стороны собственно эмбриона. Детерминирование этого эффекта значимо проявилось при врожденных пороках клапанов сердца. Вторым предиктором этой группы пороков был *IL6* rs2069827. Как уже говорилось выше, этот полиморфизм влияет на экспрессию молекулы IL-6 и для его минорного генотипа показаны повышенные концентрации IL-6 в сыворотке крови у пациентов с системной красной волчанкой [7]. Соответственно, по предикторной роли двух гомозиготных минорных генотипов *TLR6* rs5743810 и *IL6* rs2069827 в отношении врожденных пороков клапанов сердца можно говорить о конституциональной предрасположенности к формированию данной группы пороков через провоспалительный потенциал. Дополнительными предикторами, сочетано влияющими на формирование врожденных пороков клапанов сердца, были гомозиготные минорные (мутантные генотипы) *IL6R* rs2229238 и *IL8* rs4073. Мутантный гомозиготный генотип *IL6R* rs2229238 вносит дополнительный вклад в провоспалительный потенциал через регуляторную сеть IL-6. Показаны ассоциации этого полиморфного участка гена рецептора IL-6 с кальцификацией биопротезов митрального клапана сердца [17]. Молекула IL-8 является основным провоспалительным хемокином, конституциональный повышенный синтез которого может быть причиной развития и поддержания огромного количества заболеваний с аутовоспалительным патогенезом. Об этом свидетельствует большое количество исследований в этом направлении [14]. Полученные результаты необходимо учитывать и при хирургическом лечении этой группы врожденных пороков сердца, так как провоспалительный потенциал, реализуемый через IL-6 и IL-8, может проявиться в виде осложнений раннего и отдаленного периодов после кардиохирургического лечения.

Значимым предиктором коарктации аорты был мутантный генотип *IL6R* rs2228145. Как уже говорилось выше, этот генотип был ассоциирован с как с аутовоспалительной патологией сердца, так

и с патологической кальцификацией биологического протеза митрального клапана [17]. Вторым полиморфизмом, положительно ассоциированным как врожденными пороками клапанов сердца, так и с коактацией аорты был минорный генотип *IL8* rs4073, для которого получено большое количество ассоциаций с инфекционной, аутовоспалительной и аутоиммунной патологией [14]. Таким образом, по этим генетическим маркерам можно говорить о патогенетической связи между врожденными пороками клапанов сердца и коарктацией аорты. Различия в детерминировании этих двух групп ВПС касались полиморфного варианта гена *TLR2* rs5743708. Для коарктации аорты минорный генотип вносил дополнительный предикторный вклад, а для врожденных пороков клапанов сердца, напротив, протекторный. Как уже говорилось выше, данный полиморфизм детерминирует миссенс-мутацию, которая приводит к изменению структуры рецептора. Согласно базе данных National Library of Medicine (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>), этот генотип является фактором риска для формирования хронических инфекционных заболеваний, вызванных *Borrelia burgdorferi* и *Mycobacterium tuberculosis* [15]. Доказано, что мутантный TLR2 не способен эффективно образовывать гетеродимеры с TLR6 и активировать внутриклеточные каскады до NF-κB. Таким образом, этот полиморфизм детерминирует сниженный внутриклеточный сигнал для транскрипции. Как видно из таблицы 5, вклад в детерминирование коарктации аорты вносил как минорный генотип *TLR2* rs5743708, так и мажорный генотип *TLR6* rs3775073, также кодирующий миссенс-мутацию. В отношении врожденных пороков клапанов сердца, ситуация была прямо противоположной. Детерминирование данной патологии было связано с сочетанным действием мутантного генотипа *TLR6* rs5743810 и генотипа дикого типа *TLR2* rs5743708. В целом, вполне вероятно, что формирование как коарктации аорты, так и врожденных пороков клапанов сердца может быть детерминировано через дефицит внутриклеточного сигналинга до NF-κB.

Формирование септальных врожденных пороков сердца было ассоциировано с преимущественно мажорными генотипами *TLR2* rs5743708, *TLR4* rs4986790 и *TLR6* rs3775073. Вполне вероятно, что формирование данной группы врожденных пороков сердца является результатом общего вклада всех полиморфизмов, выявленных в регрессии. Сочетанный вклад в детерминирование этой группы ВПС вносил мутантный генотип *TLR4* rs4986791, кодирующий миссенс-мутацию. Данная мутация определяет низкий уровень взаимодействия рецепторов с лигандами, в частности с липополисахаридом [18]. Именно неэффек-

ТАБЛИЦА 5. РЕЗУЛЬТАТЫ ЛИНЕЙНОЙ ЛОГИСТИЧЕСКОЙ РЕГРЕССИИ ДЛЯ ЗАВИСИМОГО ФАКТОРА – СЕПТАЛЬНЫЕ ВПС БЕЗ РАЗДЕЛЕНИЯ НА НОЗОЛОГИЧЕСКИЕ ФОРМЫ

TABLE 5. RESULTS OF LINEAR LOGISTIC REGRESSION FOR THE DEPENDENT FACTOR – SEPTAL CHD WITHOUT DIVISION INTO NOSOLOGICAL FORMS

Аналиты Analytes	Бета Beta	Стандартная ошибка Бета Standard Error Beta	В	Стандартная ошибка В Standard Error B	p-level
Свободный член логистической регрессии Free term of logistic regression			1,605	0,327	0,000*
<i>TLR2 rs5743708</i>	-0,170	0,072	-0,288	0,122	0,020*
<i>IL6R rs2228145</i>	-0,133	0,071	-0,100	0,053	0,062
<i>TLR4 rs4986790</i>	-0,427	0,193	-0,677	0,306	0,028*
<i>TLR4 rs4986791</i>	0,320	0,192	0,481	0,287	0,096
<i>TLR6 rs3775073</i>	-0,135	0,072	-0,095	0,051	0,063*
<i>TLR1_rs5743551</i>	-0,136	0,074	-0,111	0,060	0,067
<i>TNF rs1799964</i>	0,128	0,080	0,115	0,072	0,113
<i>TLR2 rs3804099</i>	-0,090	0,072	-0,067	0,054	0,216
<i>TNF rs361525</i>	-0,083	0,081	-0,131	0,126	0,302

Примечание. * – значимые различия, $p < 0,05$.

Note. *, significant differences, $p < 0.05$.

тивная активация лигандами этого сигнального пути может быть дополнительной причиной в формировании септальных врожденных пороков сердца. Другим положительно ассоциированным с септальными ВПС был мутантный генотип *TNF rs1799964*, который может влиять на экспрессию гена и повышенный синтез самой молекулы $TNF\alpha$ [8]. Вполне вероятно, что через это механизм запускается пироптоз и при неэффективности TLR-ассоциированных сигнальных путей формируется септальные врожденные пороки сердца.

Заключение

Проведенное исследование показало, что детерминирование врожденных пороков сердца связано с генами иммунной регуляции. Особое значение имеет мутация *TLR6 rs5743810*, которая была предиктором врожденных пороков клапанов сердца. Формирование врожденных пороков клапанов сердца и коарктации аорты детерминировано межгенными взаимодействиями *TLR2 rs5743708* с *TLR6 rs5743810* и *TLR2 rs5743708* с *TLR6 rs3775073* соответственно. Это указывает на

неэффективность внутриклеточных сигнальных путей до NF- κ B. В то же время эти две группы врожденных пороков сердца детерминированы сочетанным воздействием генов провоспалительных цитокинов, определяющих нарушения в регуляторной сети IL-6 и повышенный синтез IL-8. Для врожденных пороков клапанов сердца такими полиморфными участками генов были *IL6 rs2069827*, *IL6R rs2229238* и *IL8 rs4073*, а для коарктации аорты – *IL6R rs2228145*, *IL8 rs4073*. Формирование септальных врожденных пороков сердца связано с общим вкладом в детерминирование этой патологии полиморфных вариантов генов *TLR* и цитокинов. Сочетанное влияние на этот процесс имеют миссенс-мутация в гене *TLR4 rs4986790* и мутация *TNF rs1799964*, приводящая к повышенному синтезу молекулы $TNF\alpha$. Вклад взаимодействия генов *TLR* и цитокинов в формирование ВПС в целом не значителен. Данные о высоком провоспалительном потенциале в группе врожденных пороков клапанов сердца и коарктации аорты необходимо учитывать в постнатальном периоде при проведении кардиохирургического лечения этих нозологий.

Список литературы / References

1. Борисенко Д.В., Ивкин А.А., Шукевич Д.Л. Современные методы ограничения системного воспалительного ответа при коррекции врожденных пороков сердца у детей в условиях искусственного кровообращения. Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний, 2021. Т. 10, № 2. С. 113-124. [Borisenko D.V., Ivkin A.A., Shukevich D.L. Treatment of systemic inflammatory response syndrome following on-pump pediatric congenital heart surgery. *Kompleksnye problemy serdechno-sosudistykh zabolevaniy* = *Complex Issues of Cardiovascular Diseases*, 2021, Vol. 10, no. 2, pp. 113-124. (In Russ.)]
2. Кузубаева Н.К. Распространенность врожденных пороков сердца у детей. Лечащий Врач, 2021. № 9. С. 48-52. [Kuzibaeva N.K. Aspects of the prevalence of congenital heart diseases in early age children in the Republic of Tajikistan. *Lechaschi Vrach*, 2021, no. 9, pp. 48-52. (In Russ.)] doi: 10.51793/OS.2021.24.9.009.
3. Лакин Г.Ф. Биометрия. М.: Высшая школа, 1990. 352 с. [Lakin G.F. Biometrics]. Moscow: Higher School, 1990. 352 p.
4. Полетаев А.Б., Морозов С.Г., Ковалев И.Е. Регуляторная метасистема (иммунонейроэндокринная регуляция гомеостаза). М.: Медицина, 2002. 168 с. [Poletaev A.B., Morozov S.G., Kovalev I.E. Regulatory metasystem (immunoneuroendocrine regulation of homeostasis)]. Moscow: Medicine, 2002. 168 p.
5. Цепкина А.В., Хуторная М.В., Шабалдин А.В., Понасенко А.В. Особенности распределения генотипов полиморфных вариантов rs2234246 и rs4711668 TREM-1 у детей с дуктус-зависимыми врожденными пороками сердца // Трансляционная медицина, 2019. Т. 6, № 4. С. 5-12. [Tsepokina A.V., Khutornaya M.V., Shabaldin A.V., Ponasenko A.V. The role of gene TREM-1 at children who have operation congenital heart diseases. *Translyatsionnaya meditsina* = *Translational Medicine*, 2019, Vol. 6, no. 4, pp. 5-12. (In Russ.)]
6. Amjadi F., Zandieh Z., Mehdizadeh M., Aghajanipour S., Raoufi E., Aghamajidi A., Aflatoonian R. The uterine immunological changes may be responsible for repeated implantation failure. *J. Reprod. Immunol.*, 2020, Vol. 138, 103080. doi: 10.1016/j.jri.2020.103080.
7. Bhatnager R., Jalthuria J., Sehrawat R., Nanda S., Dang A.S. Evaluating the association of TNF α promoter haplotype with its serum levels and the risk of PCOS: A case control study. *Cytokine*, 2019, Vol. 114, pp. 86-91.
8. Bradshaw E.A., Martin G.R. Screening for critical congenital heart disease: advancing detection in the newborn. *Curr. Opin. Pediatr.*, 2012, Vol. 24, no. 5, pp. 603-608.
9. Byrne A., MacDonald J., Buckley S. Reading, language and memory skills: a comparative longitudinal study of children with Down syndrome and their mainstream peers. *Br. J. Educ. Psychol.*, 2002, Vol. 72, Pt. 4, pp. 513-529.
10. Chadha S., Behl T., Bungau S., Kumar A., Arora R., Gupta A., Uddin M.S., Zengin G., Aleya L., Setia D., Arora S. Mechanistic insights into the role of pyroptosis in rheumatoid arthritis. *Curr. Res. Transl. Med.*, 2020, Vol. 68, no. 4, pp. 151-158.
11. Fahed A.C., Gelb B.D., Seidman J.G., Seidman C.E. Genetics of congenital heart disease: the glass half empty. *Circ. Res.*, 2013, Vol. 112, no. 4, pp. 707-720.
12. Kutikhin A.G., Ponasenko A.V., Khutornaya M.V., Yuzhalin A.E., Zhidkova I.I., Salakhov R.R., Golovkin A.S., Barbarash O.L., Barbarash L.S. Association of TLR and TREM-1 gene polymorphisms with atherosclerosis severity in a Russian population. *Meta Gene*, 2016, Vol. 19, no. 9, pp. 76-89.
13. Li C., Li X., Pang S., Chen W., Qin X., Huang W., Yan B. Novel and Functional DNA Sequence Variants within the GATA6 Gene Promoter in Ventricular Septal Defects. *Int. J. Mol. Sci.*, 2014, Vol. 15, no. 7, pp. 12677-12687.
14. Liu W., Wang C., Tang L., Yang H. Associations between gene polymorphisms in pro-inflammatory cytokines and the risk of inflammatory bowel disease: a meta-analysis. *Immunol Invest.* 2021; 50(8):869-883. doi: 10.1080/08820139.2020.1787438.
15. Oğus A.C., Yoldas B., Ozdemir T., Uguz A., Olcen S., Keser I., Coskun M., Cilli A., Yegin O. T The Arg753Gln polymorphism of the human toll-like receptor 2 gene in tuberculosis disease. *Eur Respir J.* 2004, Vol. 23, no. 2, pp. 219-223. doi: 10.1183/09031936.03.00061703.
16. Paradowska-Gorycka A., Roszak M., Stypinska B., Lutkowska A., Walczyk M., Olesinska M., Wajda A., Piotrowski P., Puszczewicz M., Majewski D., Jagodzinski P.P. IL-6 and TGF- β gene polymorphisms, their serum levels, as well as HLA profile, in patients with systemic lupus erythematosus. *Clin. Exp. Rheumatol.*, 2019, Vol. 37, no. 6, pp. 963-975.
17. Ponasenko A.V., Khutornaya M.V., Kutikhin A.G., Rutkovskaya N.V., Tsepokina A.V., Kondyukova N.V., Yuzhalin A.E., Barbarash L.S. A genomics-based model for prediction of severe bioprosthetic mitral valve calcification. *Int. J. Mol. Sci.*, 2016, Vol. 17, no. 9, 1385. doi: 10.3390/ijms17091385.
18. Richard K., Piepenbrink K.H., Shirey K.A., Gopalakrishnan A., Nallar S., Prantner D.J., Perkins D.J., Lai W., Vlk A., Toshchakov V.Y., Feng C., Fanaroff R., Medvedev A.E., Blanco J.C.G., Vogel S.N. A mouse model of human TLR4 D299G/T399I SNPs reveals mechanisms of altered LPS and pathogen responses. *J. Exp. Med.*, 2021, Vol. 218, no. 2, e20200675. doi: 10.1084/jem.20200675.

19. Semlali A., Almutairi M., Rouabhia M., Parine N.R., Amri A.A., Al-Numair N.S., Hawsawi Y.M., Alanazi M.S. Novel sequence variants in the TLR6 gene associated with advanced breast cancer risk in the Saudi Arabian population. *PLoS One*, 2018, Vol. 13, no. 11, e0203376. doi: 10.1371/journal.pone.0203376.
20. Shabaldin A.V., Shmulevich S.A., Chistyakova G.N., Remizova I.I., Lukoyanycheva E.B., Gorshkova S.V., Shabaldina E.V. Peculiarities of allogenic interactions in the short-term culture of lymphocytes of spouses who have children with congenital heart diseases or early reproductive losses. *Medical Immunology (Russia)*, 2019, Vol. 21, no. 2, pp. 279-292. doi: 10.15789/1563-0625-2019-2-279-292.
21. Wang H., Zhou S., Zhang J., Lei S., Zhou J. Correlations between TLR polymorphisms and inflammatory bowel disease: a meta-analysis of 49 case-control studies. *Immunol Res.*, 2019, Vol. 67, no. 1, pp. 142-150.
22. Wang J., Luo X.-J., Xin Y.-F., Liu Y., Liu Z.-M., Wang Q., Yang Y.-Q. Novel GATA6 mutations associated with congenital ventricular septal defect or tetralogy of fallot. *DNA Cell Biol.*, 2012, Vol. 31, no. 11, pp. 1610-1617.

Авторы:

Шабалдин А.В. — д.м.н., доцент, ведущий научный сотрудник лаборатории пороков сердца отдела хирургии сердца и сосудов ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», г. Кемерово, Россия

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

Шмелевич С.А. — к.м.н., врач детский кардиолог ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», г. Кемерово, Россия

Authors:

Shabaldin A.V., PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Leading Research Associate, Laboratory of Heart Diseases, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation

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

Shmulevich S.A., PhD (Medicine), Pediatric Cardiologist, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation

Поступила 21.03.2022

Отправлена на доработку 28.03.2022

Принята к печати 30.03.2022

Received 21.03.2022

Revision received 28.03.2022

Accepted 30.03.2022

ВЛИЯНИЕ МУТАЦИОННЫХ ВАРИАНТОВ СПАЙКОВОГО ГЛИКОПРОТЕИНА И РНК-ЗАВИСИМОЙ РНК-ПОЛИМЕРАЗЫ (nsp12) SARS-CoV-2 НА УЧАСТКИ СТЫКОВКИ С РЕМДЕСИВИРОМ

Давуд Али А.

Мосульский университет, г. Мосул, Ирак

Резюме. В связи с быстрым развитием и эволюцией новых вариантов SARS-CoV-2 возникли проблемы, касающиеся их потенциального влияния на эффективность существующих вакцин. При этом наиболее значимые мутации касаются гена спайкового гликопротеина вируса. Ремдесивир, ингибирующий активность РНК-зависимой РНК-полимеразы (РдРп), является единственным препаратом, принятым FDA для лечения COVID-19 (nsp12). Исследовалось связывание (стыковка) гибкого лиганда (ремдесивира) с жесткими рецепторами (спайковый белок и РдРп). В ряде работ было обнаружено, что мутации спайкового гликопротеина и РдРп оказывают существенное влияние на поведение вируса и, в конечном счете, — на состояние здоровья человека. Показано, что позиция стыковки ремдесивира со спайковым белком и РдРп не определяется мутациями в недостающих петлях. Ремдесивир может связываться только с В- и С-цепями спайкового белка. Некоторые мутации могут передаваться в отдельных вариантах без изменения типа аминокислот, как, например, K417N, L452R, N501Y, D614G, T716I и S982A.

Ключевые слова: COVID-19, ремдесивир, РНК-зависимая РНК-полимераза, спайковый белок, мутации

INFLUENCE OF SARS-CoV-2 VARIANTS' SPIKE GLYCOPROTEIN AND RNA-DEPENDENT RNA POLYMERASE (nsp12) MUTATIONS ON REMDESIVIR DOCKING RESIDUES

Ali Adel Dawood

University of Mosul, Mosul, Iraq

Abstract. Rapid emergence and evolution of novel SARS-CoV-2 variants has raised concerns about their potential impact on efficiency of currently available vaccines. Among the most significant target mutations in the virus are those of the spike glycoprotein. Remdesivir, which inhibits the polymerase activity of the RNA-dependent RNA polymerase RdRp, is the only medicine approved by FDA for treatment of COVID-19 (nsp12). The docking features of the flexible ligand (remdesivir) with the stiff receptors was investigated in the present study (S protein and RdRp interaction). In various studies, the spike glycoprotein and RdRp mutations were found to have a significant influence upon viral behaviour and, as a result, affect human health. The docking position of remdesivir with the S and RdRp proteins was shown to be unaffected by mutations in the missing loops. The remdesivir can only bind the B and C chains of S protein. Some mutations can be transferred between variations, without changing the type of amino acid, such as K417N, L452R, N501Y, D614G, T716I, and S982A.

Keywords: COVID-19, remdesivir, RdRp, S protein, mutation

Адрес для переписки:

Али А. Давуд
Медицинский колледж Мосульского университета
Аль-Джамеа, 1, г. Мосул, Ирак.
Тел.: 00964 (770)-176-8002.
E-mail: aad@uomosul.edu.iq

Address for correspondence:

Ali A. Dawood
College of Medicine, University of Mosul
Al-Jameaa, st. 1, Mosul, Iraq.
Phone: 00964 (770)-176-8002.
E-mail: aad@uomosul.edu.iq

Образец цитирования:

Али А. Давуд «Влияние мутационных вариантов спайкового гликопротеина и РНК-зависимой РНК-полимеразы (nsp12) SARS-CoV-2 на участки стыковки с ремдесивиром» // Медицинская иммунология, 2022. Т. 24, № 3. С. 617-628.
doi: 10.15789/1563-0625-IOS-2486
© Давуд Али А., 2022

For citation:

Ali A. Dawood "Influence of SARS-CoV-2 variants' spike glycoprotein and RNA-dependent RNA polymerase (nsp12) mutations on remdesivir docking residues", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2022, Vol. 24, no. 3, pp. 617-628.
doi: 10.15789/1563-0625-IOS-2486
DOI: 10.15789/1563-0625-IOS-2486

Introduction

Despite the fact that COVID-19 has been vaccinated against by over half of the world's population, the virus continues to kill thousands of people and spread disease. Viral proteins have altered since the discovery of the Indian Delta variants, resulting in an increase in the number of cases. A novel coronavirus strain that produces COVID-19 has been the subject of press reports since December 2019. As a result of this, new varieties have been discovered, and they are being studied. Because it appears to be more easily transmitted from person to person, the CDC defines the delta coronavirus as a "variant" [24, 39]. As of July 2021, the SARS-CoV-2 Delta strain is the most infectious. Mutations that make a virus more dangerous, on the other hand, may hinder the virus from propagating efficiently [35].

In England, the B.1.1.7 lineage, B.1.617.2 in India, and B.1.351 in South Africa have all been identified as SARS-CoV-2 strains. Using all available resources, researchers are actively evaluating the efficacy of various medicines and vaccines against new strains with a range of escape mutations. It's unknown how these mutations influence SARS-CoV-2-host cell interactions in a systematic fashion, or if they increase morbidity [3, 26, 28]. As a result, creating broad-spectrum antiviral medicines and vaccines to tackle future SARS-CoV-2 strains will require a long-term clinical treatment strategy [1, 25].

The most important coronavirus protein is the spike protein. It's a viral transmembrane glycoprotein that helps the virus make contact with the host cell and invade it. The first protrudes from the surface of the viral particle and forms a corona-like halo. The functional components of the S protein are: S1 binds to cellular receptors on the surface of the host cell, such as ACE2, and S2 promotes cell-virus membrane fusion [32].

The viral RNA transcription and replication protein RNA-dependent RNA polymerase (nsp12) is responsible for the synthesis of viral RNA. The binding of nsp7 and nsp8 cofactors appears to be essential for SAR-CoV-2 RdRp RNA polymerase activity in order to increase RdRp binding and processivity (804 amino acids). RdRp's active site palm subdomain comprises polymerase motifs that are conserved, and its structure is comparable to those of other RNA polymerases. We chose these proteins in our study because of their relevance to the virus or the host cell [2, 15].

Any antiviral drug must target the component of the virus's life cycle that allows it to reproduce. Furthermore, a medicine must be capable of destroying viruses while causing no damage to the human cell that is infected. Viruses may also adapt to their surroundings. Because they reproduce so fast, they have a lot of opportunities to mutation (change their genetic code) with each new generation [9, 14].

Remdesivir (RDV) is an adenosine triphosphate analogue that was first discovered in 2017 to exhibit antiviral activity against the coronaviridae family. As a result, Remdesivir has sparked interest as a potential COVID-19 therapy. It has antiviral activity against numerous Ebola virus types in cell tests and monkey models. *In vitro* investigations show that Remdesivir reduces SARS-CoV by interfering with the polymerase activity of RNA-dependent RNA polymerase. Until October 2020, Remdesivir against COVID-19 was the only drug approved by the FDA. COVID-19 may be used to treat adults and adolescents aged 12 and above who weigh at least 88 pounds and have been hospitalised with COVID-19. Clinical trials suggest that Remdesivir may help these individuals recover more rapidly [12, 23, 36].

However, the molecular mechanism that allows for the maintenance of virulence is still mostly understood. We discuss how remdesivir binds to the S protein and RNA-dependent RNA polymerase (nsp12) in distinct viral strains, as well as the present state of knowledge. The goal of this research was to discover if new SARS-CoV-2 virus strains were spreading across countries. The discovery of SARS-CoV-2 variants might lead to more effective medicines, vaccines, and diagnostic tools. We investigated the development of novel SARS-CoV-2 variants with associated spike protein and RdRp mutations in a number of countries. Individual proteins with mutations at strategically important regions can alter the virus's biology [4, 15, 30, 38].

Materials and methods

In global stoichiometry with resolution 2.8, spike glycoprotein with ID (6VXX) was chosen from the PDB because it commonly lacks loops during the release process. The missing sequences were derived from the crystallographic information file's 6VXX wild type (CIF). With the discovery of the nonstructural protein (nsp12), also known as RdRp, as the primary component of the formally released protein from the RCBS PDB, this work was carried out (7OYG). The three-dimensional coordinate of the Remdesivir molecule was retrieved from the PubChem database. SARS-CoV-2 variants from different countries were chosen based on mutations in the S protein, as shown in Table 1.

Reconstruction missing loops of S protein

To determine the impact of missing loops in the S protein's interaction with the remdesivir, we used two methods to generate missing loops: creating sequences with Builder PyMOL software and utilizing a web application called ModLoop Queue. To determine the impact of missing loops in the S protein's interaction with the remdesivir, we used two methods to generate missing loops: creating sequences with Builder PyMOL software and utilizing

TABLE 1. WILD TYPE (6VXX) RESIDUES (R) COMPARED WITH 4 STRAINS OF SARS-CoV-2 IN DIFFERENT MUTATIONS

Name	Alt. Name	Detected	R 1	R 2	R 3	R 4	R 5	R 6	R 7	R 8
6VXX Wild type	QQZ48538	Mar 2020	<i>K417</i>	<i>L452</i>	<i>E484</i>	<i>N501</i>	<i>D614</i>	<i>P681</i>	<i>T716</i>	<i>S982</i>
Delta Indian variant	B.1.617.2	Dec 2020		<i>R452</i>	<i>Q484</i>		<i>G614</i>	<i>R681</i>		
UK variant	B.1.1.7	Feb 2020				<i>Y501</i>	<i>G614</i>	<i>H681</i>	<i>I716</i>	<i>A982</i>
South African variant	501Y.V2	Oct 2020	<i>N417</i>		<i>K484</i>	<i>Y501</i>	<i>G614</i>	<i>H681</i>	<i>I716</i>	<i>A982</i>
Brazilian variant	B.1.1.28.1	Dec 2020	<i>N417</i>		<i>K484</i>	<i>Y501</i>				

Note. Wild type residues = italic text. Mutation residues = bold italic text.

a web application called ModLoop Queue. Because the S protein is made up of three identical chains, the missing sequences were created in the same regions where mutations occurred and are listed in Table 1 for each variant. The starting missing loop (SER-469) is built on the C-terminal of the (ILE-468). Continuing residues were built on the following sequences: THR (470)-GLU-ILE-TYR-GLN-ALA-GLY-SER-THR-PRO-CYS-ASN-GLY-VAL-GLU-GLY-PHE-ASN-CYS (488). The CYS488 was built on the N-terminal of the TYR-489 residue. Another missing loop was started with GLN-677 which is built on the C-terminal of the residue (THR-676). The missing loop is GLN (677)-THR-ASN-SER-PRO-SER-GLY-ALA-GLY-SER-VAL-ALA. The last residue (ALA-688) was built on the N-terminal of the (SER-689) residue.

Molecular docking of remdesivir in the S and RdRp proteins

The binding location and impact of the antiviral medication (remdesivir triphosphate) with the SARS-CoV-2 S protein and RdRp were investigated using the AutoDock 4.2 molecular modelling simulation and PyRx protein ligand docking programmes. The interaction affinity as a scoring function was explored by docking protein molecules with remdesivir in a sequential manner. The docked complexes were visualized using UCSF Chimera and PyMOL. The interacting residues were investigated using the BIOVIA discovery studio. The built-in cavity identification method was used to identify potential binding locations. Each docking procedure was subjected to four runs. In addition, with a 100 Kcal/mol energy barrier, the maximum iterations were 1000. To identify the best conformations for each docking procedure, the lowest docked binding energy was employed [6, 8]. The missing hydrogen atoms were then added utilizing the BIOVIA discovery studio built-in technique, with specific attention paid to histidine (HIS) residues to add their H atoms depending on their microenvironment.

For the molecular simulation results, the five docking models with the highest binding energy and the most appropriate binding sites for a systematic

analysis of drug-S protein interactions were chosen. Based on protein structure, distribution characteristics, and polarity qualities of amino acid residues around the remdesivir molecule's binding sites, the molecular interaction technique and bioisosterism strategy were utilised to optimise three docking molecules. The new compounds created following optimization were simulated and evaluated using the same method, resulting in molecules with higher binding energies and tighter interactions. To test the accuracy of the remdesivir results, a short molecular dynamics (MD) simulation was run for each of the expected receptor-ligand complexes. The Molegro Virtual Docker was used to validate protein-ligand interactions and construct the molecular dock score and posture energy grid.

Results

Construction of missing loops

There is a clear contrast between the residues created using Builder PyMOL and ModLoop in the current investigation. As shown in Figure 1, the result clearly reveals that the ModLoop is more exact in distinguishing residue locations.

We found that remdesivir interacts with chain B of the S protein (6VXX) but not with chain A on multiple occasions, as shown in Figure 2. Following the loading of missing loops, we displayed changes to the Indian delta version of chain A. The most prevalent variant mutations in the S protein sequence in India are L452R, E484Q, D614G, and P681R. Other mutations are far away, whereas E484Q and P681R are located in the missing loops. Remdesivir (RDV) had no interaction with chain A, suggesting that the changes were unconnected. The magenta missing loops were created with the PyMOL builder, while the blue missing loops were created with ModLoop. D614G is closer to RDV's location than RDV is to D614G.

Molecular docking of the RDV with the B and C chains of S protein with missing loops

According to the current study, RDV has the strongest contact with the B and C chains of S protein. We performed RDV on the chain B of the UK variant

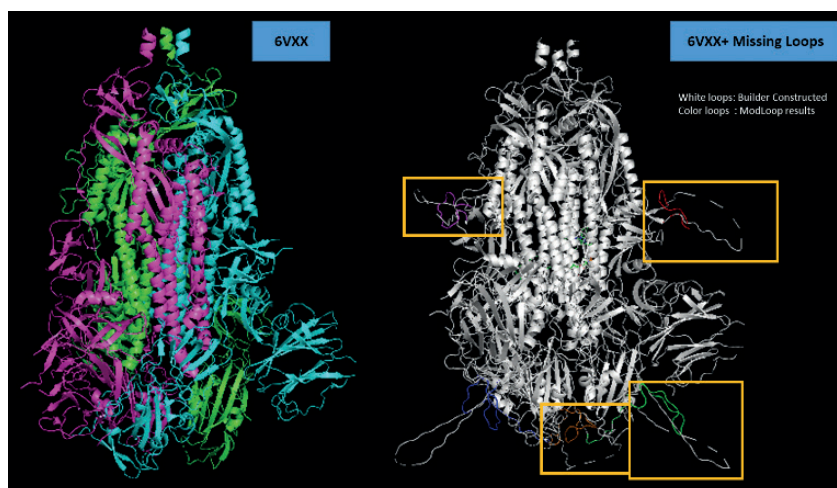


Figure 1. Crystal structure of S protein (6VXX)

Note. Left, cartoon structure shows three colored chains of wild 6VXX. Right, cartoon structure shows the missing loops: White loops constructed by Builder PyMOL. Colored loops constructed by ModLoop program.

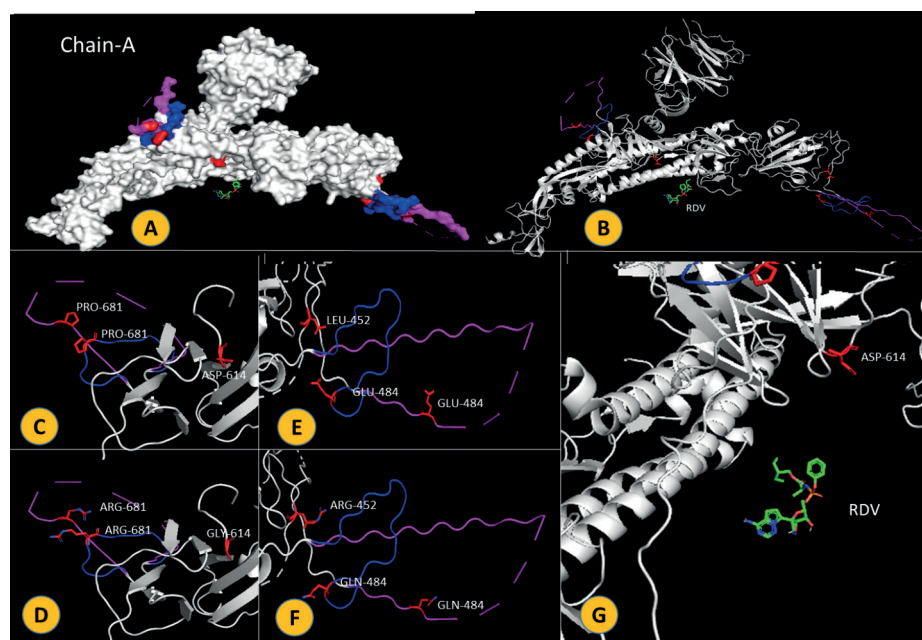


Figure 2. Chain A of S protein and its mutations show interaction with RDV

A, chain A surface view shows missing loops (colored). B, chain A cartoon view. C, Wild P681 (PRO-681) residue (magenta and blue) is in the missing loops and D614 (ASP-614) residue is in the main chain. D, mutated R681 (ARG-681) residue is in the missing loops and mutated G614 (GLY-614) residue is in the main chain. E, wild E484 (GLU-484) residue is in the missing loops and L452 (LEU-452) residue is in the main chain. F, mutated Q484 (GLN-484) residue is in the missing loops and R452 (ARG-452) residue is in the main chain. G, no docking was found between RDV and any residue in chain A.

S protein with the mutations after synthesizing the missing loops (N501Y, D614G, P681H, T716I, and S982A). Only the P681H mutation is present in the missing loops. Figures 3, 4 show that S982A is closer to the RDV docking point as a result of this outcome. The RDV docking pose with the S protein chains B and C revealed conventional hydrogen bonds in the residues (B: ARG-1014, C: ARG-765, GLY769, and LEU-1012), as well as a new hydrogen bond in the

C: GLN-762 residue, an unfavorable positive bond (red), a pi-sigma bond in the B: ALA-958 residue, and a pi-alkyl bond in the B: ALA-958 residue. Binding affinity and root-mean-square distance (RMSD) were calculated to choose the best pose with upper and lower RMSD. The best selected docking model is the first one when the RMSD/up, lb is equal to zero and the binding affinity is (-5.9). The first and third models have the highest MoleDock scores (-116.29

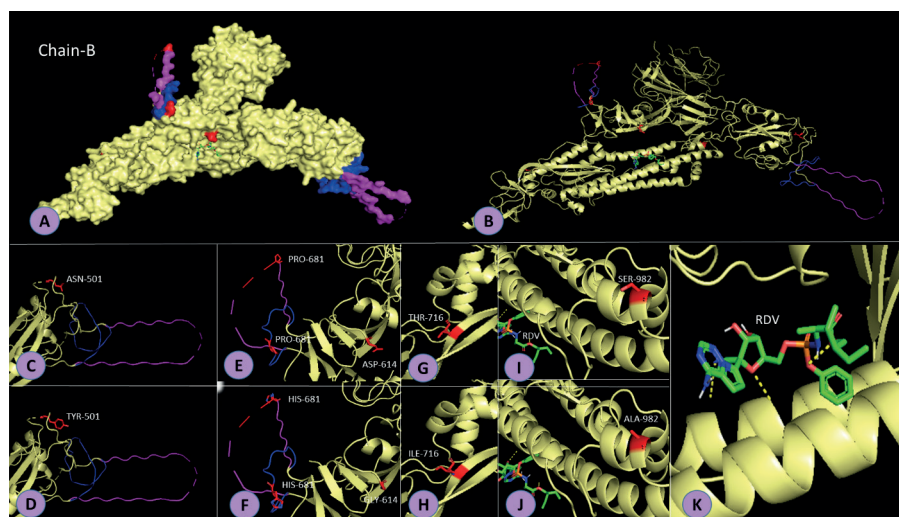


Figure 3. Molecular docking of RDV with chain B of the wild and mutation residues

Note. A, RDV interacts with the chain B surface view and shows missing loops (colored). B, chain B ribbon view with RDV docking (green color). C, N501 (ASN-501) wild residue is in the main chain and the missing loops (magenta and blue). D, mutated Y501 (TYR-501) residue is in the main chain with the missing loops. E, wild P681 (PRO-681) residue (magenta and blue) is in the missing loops and D614 (ASP-614) residue is in the main chain. F, mutated H681 (HIS-681) residue is in the missing loops and mutated G614 (GLY-614) residue is in the main chain. G, wild T716 (THR-716) residue. H, mutated I716 (ILE-716) residue. I, wild S982 (SER-982) residue is closer to the RDV docking. J, mutated A982 (ALA-982) residue. K, interaction between RDV and S protein (chain B).

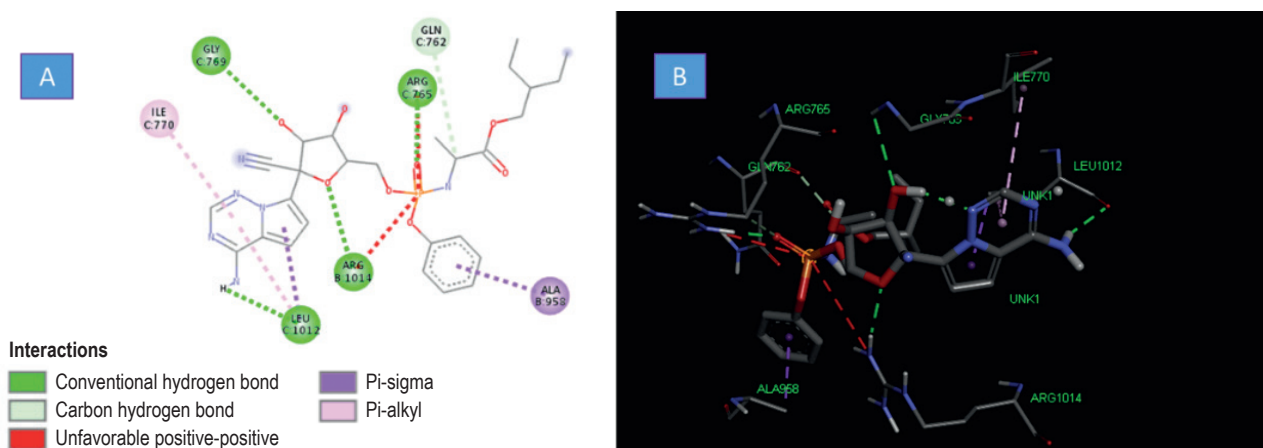


Figure 4. Molecular docking of remdesivir (RDV) with the S protein

Note. A, 2D pose docking shows conventional hydrogen bonds ARG-1014 residue is in the chain B and (ARG-765, GLY769, and LEU-1012) residues are in the chain C (green), new hydrogen bond of GLN-762 residue is in chain C (grey), unfavorable positive bond (red), Pi-sigma bond is in the ALA-958 residue of the chain B (purple), and Pi-alkyl bond is in the ILE-770 residue in the chain C (magenta). B, RDV-6VXX interactions in the 3D structure.

and -120.287 respectively). The best protein-ligand gird score is showed with the first model (-74.4338) and the highest Rerank score (-113.599) of the fourth model. This interaction formed 4 conventional H-bonds with B: ARG-1014, C: ARG-765, GLY-769, and LEU-1014. A novel hydrogen bond was formed with C: GLN-762. Molegro Virtual Docker was used to predict ligand scores such as Grid, MolDock, and Rerank, Table 2. The best energy pose is under -40, Figure 5.

Following the construction of the missing loops, we performed RDV on chain C of the S protein of the South African variety with mutations (K417N, E484K, N501Y, D614G, P681H, T716I, and S982A). The missing loops contain mutations E484K and P681H. All mutations are far from the fusion. The RDV docking position is shared by Chains B and C, as shown in Figure 6.

After modeling the missing loops, we performed RDV on the chain B of the S protein of the Brazilian version with mutations (K417N, E484K, and

TABLE 2. BINDING AFFINITY, UPPER BOUND RMSD/ub AND LOWER BOUND RMSD/lb DEGREE OF THE TOP OF INTERACTION MODELS BETWEEN RVD AND S PROTEIN EXTRACTED BY PyRx

6VXX-RDV	Binding Affinity	RMSD/ub	RMSD/lb	GRID Score	MolDock Score	Rerank Score
6VXX_121304011_uff_E = 1044.71	-5.9	0	0	-74.4338	-116.29	-96.6824
6VXX_121304012_uff_E = 1044.71	-4.5	13.996	9.456	-73.9069	-108.534	-98.4069
6VXX_121304013_uff_E = 1044.71	-4.5	17.778	12.044	-65.0775	-91.9958	-80.1375
6VXX_121304014_uff_E = 1044.71	-4.4	13.858	10.585	-64.7753	-120.287	-113.599
6VXX_121304015_uff_E = 1044.71	-4.4	17.451	11.529	-60.6775	-104.732	-85.1287

Note. Grid, MolDock, and Rerank were estimated by Molegro Virtual Docker.

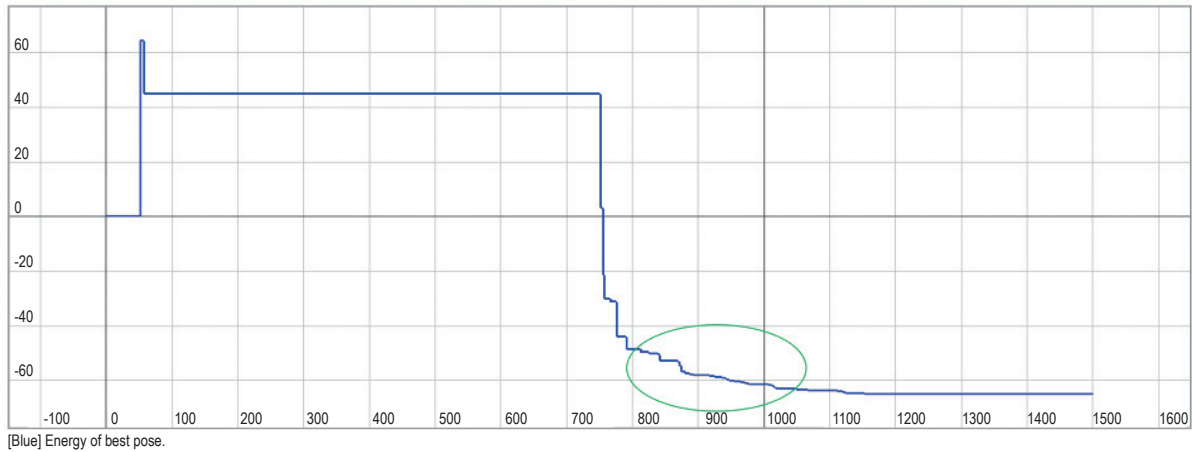


Figure 5. Schematic graph shows the energy poses the blue line of 6VXX-RDV interaction extracted from Molegro Virtual Docker

Note. The best docking score is in the green circle.

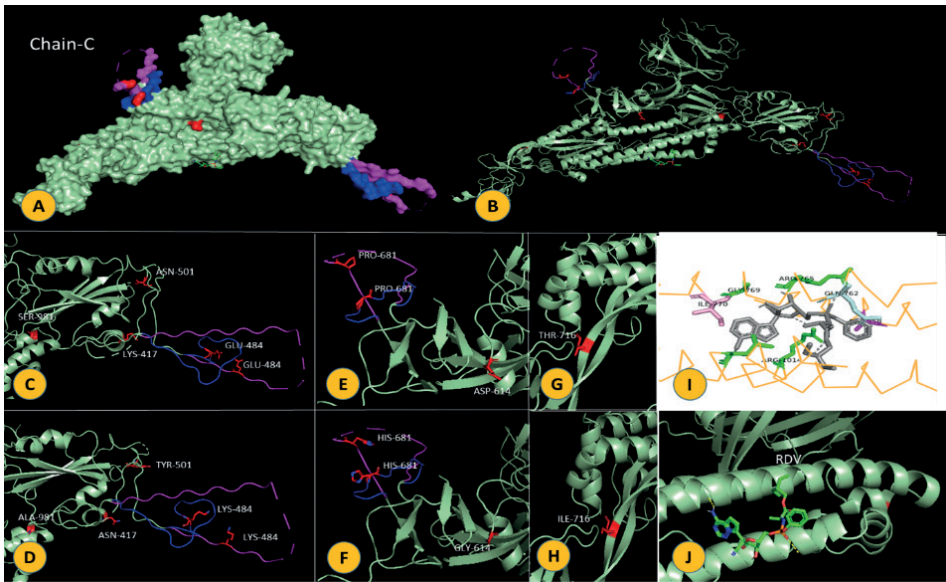


Figure 6. RDV-Chain C docks in the wild and mutation residues

Note. A, RDV interacts with the chain C surface view and shows missing loops (colored). B, chain C ribbon view with RDV docking (green color). C, N501 (ASN-501), S981 (SER-981), and K417 (LYS-417) wild residues are in the main chain and E484 (GLU-484) residue is in the missing loops (magenta and blue). D, mutated Y501 (TYR-501), A981 (ALA-981), and N417 (ASN-417) residues are in the main chain and K484 (LYS-484) residue is in the missing loops. E, wild P681 (PRO-681) residue (magenta and blue) is in the missing loops and D614 (ASP-614) residue is in the main chain. F, mutated H681 (HIS-681) residue is in the missing loops and mutated G614 (GLY-614) residue is in the main chain. G, wild T716 (THR-716) residue. H, mutated I716 (ILE-716) residue. I, RDV interacts with the C chain residues (ILE-770, GLY-769, ARG-765, GLN-762, ARG-1014, and ALA-958). J, RDV-6VXX chain C interaction cartoon view.

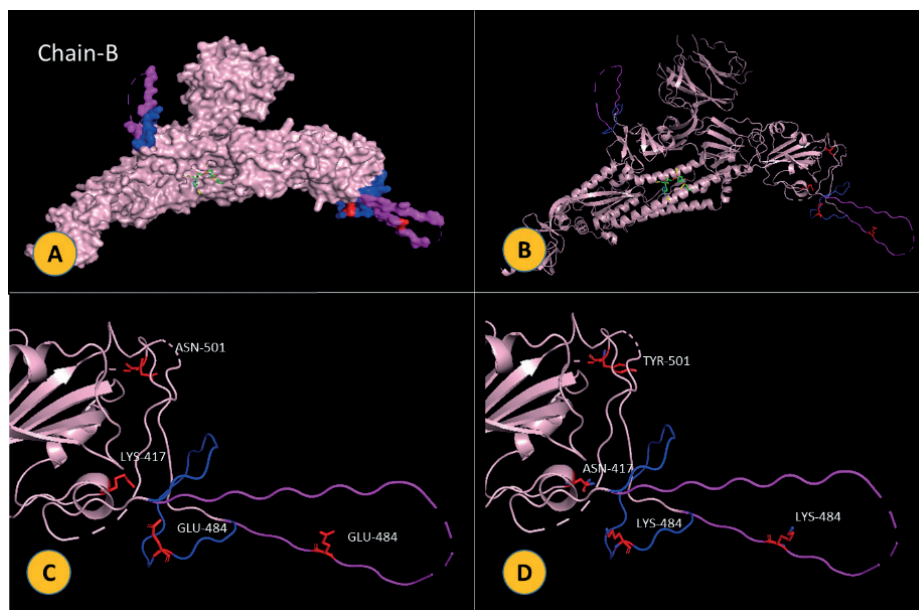


Figure 7. RDV-Chain B interactions of wild and mutation residues

Note. A, RDV interacts with the chain B surface view and shows missing loops (colored). B, chain B ribbon view with RDV docking (green color). C, N501 (ASN-501) and K417 (LYS-417) wild residues are in the main chain and wild E484 (GLU-484) is in the missing loops (magenta and blue). D, mutated Y501 (TYR-501) and N417 (ASN-417) residues are in the main chain and mutated K484 (LYS-484) residue is in the missing loops.

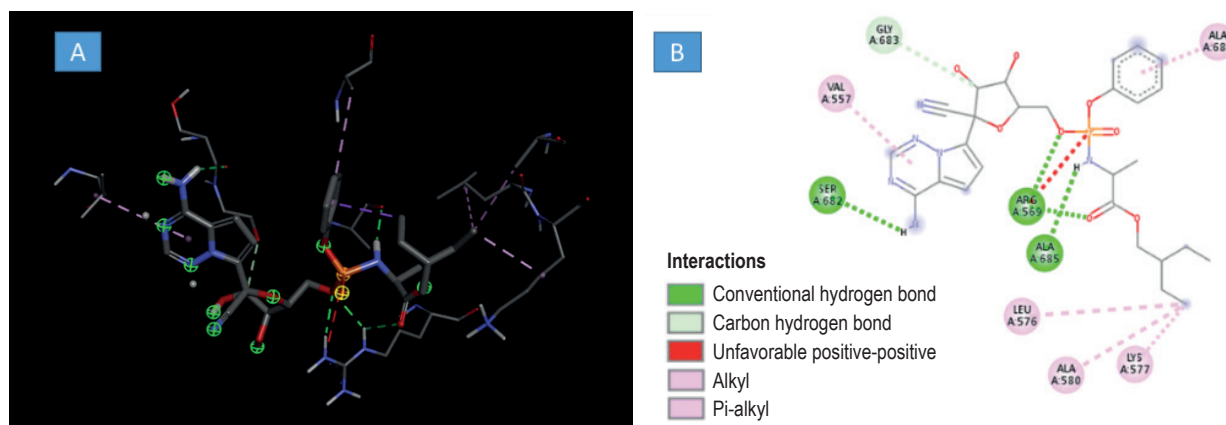


Figure 8. Molecular docking pose of RDV-RdRp

Note. A, the crystal structure of the pose interaction shows the colored bonds. B, 2D structure of molecular atoms interaction shows 3 conventional hydrogen green bonds (A: ARG-569, SER-682, and ALA-685). A novel carbon hydrogen grey bond (A: GLY-683). 3 alkyl pale magenta bonds (A: LEU-576, LYS-577, and ALA-580). Pi-alkyl dark magenta bond (A: ALA-688).

N501Y). In the missing loops, the E484K mutation is discovered. Figure 7 shows how all mutations are situated far away from the docking stance.

Molecular docking of the RDV with RdRp (nsp12)

RDV has an excellent fusion with RdRp, it has been discovered. Rerecording of the most applicable bonds: Figure 8 shows three conventional hydrogen bonds (ARG-569, SER-682, and ALA-685), a new carbon-hydrogen bond (A: GLY-683), three alkyl bonds (A: LEU-576, LYS-577, and ALA-580), a Pi-alkyl bond (A: ALA-688) and an unfavourable positive-positive interaction with the residue (A:

ARG-569). The top five docking models were chosen based on their greatest binding affinity and lowest RMSD/ub, lb characteristics. The first model has the highest binding affinity when the RMSD equal to zero. Not only that but the MolDock score for the first model is considered the highest (-100.334) with the GRID score (-51.3551) but the Rerank score is less than other models (-19.4025). The lowest MolDock score related to the fourth model with the GRID and Rerank score -27.9188, -29.6737 respectively, Table 3. The best energy pose is under -40, Figure 9. Only one mutation has been determined in the RdRp (P323L).

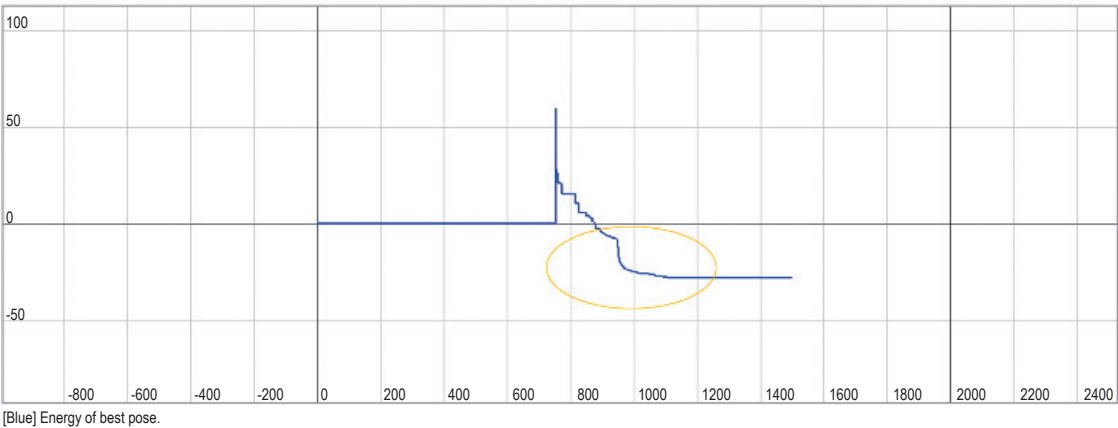


Figure 9. Schematic graph shows the energy poses the blue line of RdRp-RDV interaction extracted from Molegro Virtual Docker

Note. The best docking score is in the orange circle.

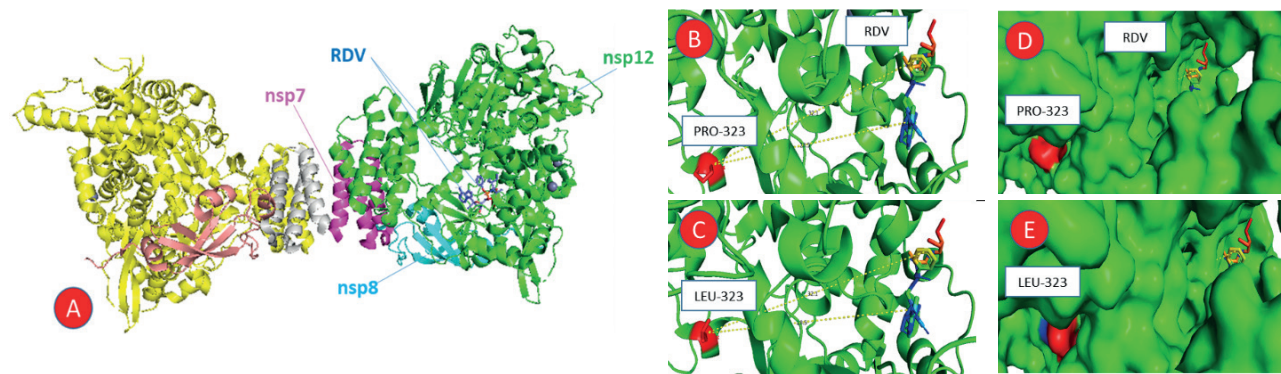


Figure 10. RDV-RdRp docks of wild and mutation residues

Note. A, RDV interacts with the nsp12 cartoon view. B, wild P323 (PRO-323) residue in the nsp12 is closer to the RDV docking site (blue). C, mutated L323 (LEU-323) residue. D, wild P323 (PRO-323) residue shows the surface view. E, mutated L323 (LEU-323) residue shows the insider pocket in the surface view.

TABLE 3. BINDING AFFINITY, UPPER BOUND RMSD/ub AND LOWER BOUND RMSD DEGREE OF THE TOP OF INTERACTION MODELS BETWEEN RVD AND RdRp EXTRACTED BY PyRx

RdRp-RDV	Binding Affinity	RMSD/ub	RMSD/lb	GRID Score	MolDock Score	Rerank Score
nsp12_121304011_ E = 1044.71	-7.4	0	0	-51.3551	-100.334	-19.4025
nsp12_121304012_ E = 1044.71	-7.3	31.6	28.094	-36.4412	-94.5294	-11.1266
nsp12_121304016_ E = 1044.71	-7.1	53.41	50.312	-33.0435	-63.576	-42.8843
nsp12_121304014_ E = 1044.71	-7	31.565	28.01	-27.9188	-37.6395	-29.6737
nsp12_121304015_ E = 1044.71	-6.9	4.623	2.491	-24.3764	-73.0735	-31.9112

Note. Grid, MolDock, and Rerank were estimated by Molegro Virtual Docker.

With the RDV, the distance between the mutation site and the docking posture is randomly assessed at 28.5 and 32.1. In the current investigation, there was no difference in the distance between natural and mutant RdRp and RDV residues. There are no evident structural variations in RdRp structure between the wild and mutant forms, as shown in Figure 10.

Discussion

The worldwide economy and health system have been hit by the COVID-19 outbreak like never before. SARS-CoV-2 has a high level of transmissibility and tissue tropism in a wide range of tissues [29, 32].

This study focused on interventional treatments that target the SARS-CoV-2 viral entry machinery, such as spike protein or RdRp. Several remedies have recently been proposed and are receiving considerable investigation, including small-molecule medicines, antibodies, and antiviral peptides. At the molecular level, SARS-CoV-2 interactions with any medicine are investigated, and this information is critical for prevention and treatment. A variety of trajectories from long molecular dynamics (MD) simulations of the SARS-CoV-2 S protein are now available in the public domain [5, 7, 13, 20, 21].

The most prevalent share mutations in all of the selected nations are E484Q (K), D614G, and P681R (H), according to an analysis of the mutations in the various variants of the virus under study. When it comes to constructing missing loops, the ModLoop Queue software outperforms Builder PyMol. According to our findings, the fusion position of the remdesivir is restricted to the B and C chains within the following residues: B-(A958 and R1014), C-(Q762, R765, G769, I770, and L1012) respectively. Despite the presence of weak carbon-hydrogen bonds and unfavorable bonds as a result of the docking (6VXX-RDV), the binding affinity and electrostatic energy were high.

In the missing loops, the delta Indian version contains two out of four mutations: E484Q and P681R (50 percent), but the UK variation only has one out of five mutations: P681H. (20%). In the missing loops, the South African version has two out of seven mutations: E484K and P681H (28.5%), whereas the Brazilian variant has one out of three mutations: E484K. (33.3%). Extrapolating the data, it becomes evident that the missing loops include roughly half of the mutations discovered in the variants. Our study found that mutations in the missing loops did not influence on the docking location of the remdesivir with S protein. The most common mutation with the COVID-19 variants is D614G. D614G is thought to provide for a more open S protein structure, which is better for ACE2 interaction [19, 33]. The findings demonstrate that some mutations, including K417N, L452R, N501Y, D614G, T716I, and S982A, can be passed down between variants without altering the

type of amino acid. In the delta Indian variations, glutamate (E) is changed to glutamine (Q), whereas in South African and Brazilian variants, glutamate (E) is changed to lysine (K). In delta Indian variant, the proline is changed to arginine, while in the UK and South African variants, the proline is changed to histidine.

RdRp is a key target for antiviral medication development against a variety of viruses. Three RdRp inhibitors have been proposed as possible targets for SARS-CoV-2 infection: favipiravir, galidesivir, and remdesivir [19, 22, 27, 33, 36, 37]. Understanding the molecular mechanism of remdesivir's interaction with RdRp, as well as other potential targets, is critical for COVID-19 treatment development [27, 36, 37].

Although it's been speculated that the RdRp P323L mutation affects viral proofreading, resulting in a greater prevalence of downstream mutations, it's attracted less attention. According to a recent study, the RdRp mutation began to become more widespread in European viral genomes on February 20, 2020, and is associated with a greater frequency of point mutations than in Asian viral genomes. In a hydrophobic cleft near the changed P323L residue, which corresponds to mutation 14408 in the current study, a possible docking site was revealed. Drug resistance can be caused by naturally occurring mutations in RdRp, as has been previously documented [17, 22, 31, 34]. Although additional research is required to determine the underlying molecular significance of the mutations, we believe that the P323L mutation reduces the clinical manifestation of SARS-CoV-2.

It also has a high binding affinity for RdRp, which was confirmed in the current study. According to new study, RDV can bind RdRp. In the (apo) form or in combination with the RNA template primer, SARS-CoV-2 RdRp can bind to RDV. RDV binds to Mpro efficiently, according to current *in silico* studies, corroborating our idea. RDV was also shown to be more efficient than lopinavir/ritonavir *in vitro* and in MERS-CoV-infected mice. Remdesivir was revealed to have a considerable affinity for the SARS-CoV-2 virus's main protease [10, 11]. When the RMSD/ub, lb was equal to zero in the first model, the binding affinity of the RDV with the RdRp was very high in the current investigation. This docking gave the higher MolDock and GRID scores compared to the rest of the models. Furthermore, we noticed that the P323L mutation did not effect on the remdesivir docking site. The RdRp wild and mutant types had similar distances between the docking location and the P323L residue.

The improved molecules, according to molecular simulations, have a higher binding energy and may interact with a greater number of amino acid residues in a variety of ways, resulting in unfavourable interactions [16, 18]. In both molecular dynamics datasets, the primary interactions are different,

with protomers working to follow the oligomer's symmetry. Because remdesivir docks with the B and C chains of S protein, we expect the mutations to disrupt the connections that link the AC, CB, and BA chains. Overall, our findings reveal that mutations in the S protein promote enhanced infectivity in cellular systems and, using molecular modelling, provide a structural foundation for this effect. RdRp demonstrated a greater affinity for Remdesivir than S protein, and the two formed an unstable complex.

Conclusions

The most prevalent share mutations in all of the selected variants are E484Q (K), D614G, and P681R (H). Spike glycoprotein and RdRp mutations were shown to have a substantial impact on viral behavior

and, as a result, human health in several investigations. Our study found that mutations in the missing loops did not influence on the docking location of the remdesivir with S and RdRp proteins. The docking position of the remdesivir is restricted to the B and C chains of the S protein. The findings demonstrate that some mutations, including K417N, L452R, N501Y, D614G, T716I, and S982A, can be passed down between variants without altering the type of amino acid. Furthermore, we noticed that the P323L mutation did not effect on the remdesivir docking site. RdRp exhibited a greater affinity for remdesivir than S protein, and both formed an unstable complex.

Acknowledgments

The author thanks college of Medicine for documenting this paper.

References

1. Baum A., Fulton B.O., Wloga E., Copin R., Pascal K.E., Russo V., Giordano S., Lanza K., Negron N., Ni M., Wei Y., Atwal G.S., Murphy A.J., Stahl N., Yancopoulos G.D., Kyratsous C.A. Antibody cocktail to SARS-CoV-2 spike protein prevents rapid mutational escape seen with individual antibodies. *Science*, 2020, Vol. 369, pp. 1014-1018.
2. Choy K.-T., Wong A.Y.-L., Kaewpreedee P., Sia S.F., Chen D., Hui K.P.Y., Chu D.K.W., Chan M.C.W., Cheung P.P.-H., Huang X., Peiris M., Yen H.-L. Remdesivir, lopinavir, emetine, and homoharringtonine inhibit SARS-CoV-2 replication *in vitro*. *Antiviral Res.*, 2020, Vol. 178, 104786. doi: 10.1016/j.antiviral.2020.104786.
3. Dawood A., Altobje M., Alnori H. Compatibility of the ligand binding sites in the spike glycoprotein of covid-19 with those in the aminopeptidase and the caveolins 1, 2 proteins. *Res. J. Pharm. Tech.*, 2021, Vol. 14, no. 9, pp. 4760-4766.
4. Dawood A., Altobje M., Alrassam Z. Molecular docking of SARS-CoV-2 nucleocapsid protein with angiotensin-converting enzyme II. *Mikrobiol. Zhu*, 2021, Vol. 83, no. 2, pp. 82-92.
5. Dawood A., Altobje M. Inhibition of N-linked glycosylation by nunicamycin may contribute to the treatment of SARS-CoV-2. *Microbiol. Path.*, 2020, Vol. 149, 104586. doi: 10.1016/j.micpath.2020.104586.
6. Dawood A. Glycosylation, ligand binding sites and antigenic variations between membrane glycoprotein of COVID-19 and related coronaviruses. *Vacunas*. 2021, Vol. 22, no. 1, pp. 1-9.
7. Dawood A. Identification of CTL and B-cell epitopes in the Nucleocapsid Phosphoprotein of COVID-19 using Immunoinformatics. *Microbiol. J.*, 2021, Vol. 83, no. 1, pp. 78-86.
8. Dawood A. New variant of SARS-CoV-2 in South Africa. *Prog. Med. Sc.*, 2021, Vol. 5, no. 1, pp. 1-2.
9. Dawood A. Using remdesivir and dexamethasone for treatment of SARS-CoV-2 shortens the patient's stay in the hospital. *Asi an J. Pharm. Res.*, 2021, Vol. 11, Iss. 2, 138-0. doi: 10.52711/2231-5691.2021.00026.
10. Deshpande R., Tiwari P., Nyayanit N., Modak M. In silico molecular docking analysis for repurposing therapeutics against multiple proteins from SARS-CoV-2. *Eur. J. Pharmacol.*, 2020, Vol. 886, 173430. doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.173430.
11. Eskier D., Karakulah G., Suner A., Oktay Y. RdRp mutations are associated with SARS-CoV-2 genome evolution. *Peer J.*, 2020, Vol. 8, e9587. doi:10.7717/peerj.9587.
12. Eweas A., Alhossary A., Abdul-Moneim A. Molecular Docking Reveals ivermectin and remdesivir as potential repurposed drugs against SARS-CoV-2. *Front. Microbiol.*, 2021, Vol. 11, e592908. doi: 10.3389/fmicb.2020.592908.
13. Garvin M.R., Prates E.T., Pavicic M., Jones P., Amos B.K., Geiger A., Shah M.B., Streich J., Gazolla J.G.F.M., Kainer D., Cliff A., Romero J., Keith N., Brown J.B., Jacobson D. Potentially adaptive SARS-CoV-2 mutations discovered with novel spatiotemporal and explainable AI models. *Genome Biol.*, 2020, Vol. 21, 304. doi: 10.1186/s13059-020-02191-0.
14. Grein J., Ohmagari N., Shin D., Diaz G., Asperges E. Compassionate use of remdesivir for patients with severe Covid-19. *N. Engl. J. Med.*, 2020, Vol. 382, pp. 2327-2336.
15. Hall Jr., Ji H.-F. A search for medications to treat COVID-19 via in silico molecular docking models of the SARS-CoV-2 spike glycoprotein and 3CL protease. *Travel Med. Infect. Dis.*, 2020, Vol. 35, 101646. doi: 0.1016/j.tmaid.2020.101646.
16. Henderson R., Edwards R.J., Mansouri K., Janowska K., Stalls V., Gobeil S.M.C., Kopp M., Li D., Parks R., Hsu A.L., Borgnia M.J., Haynes B.F., Priyamvada acharya controlling the SARS-CoV-2 spike glycoprotein conformation. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 2020, Vol. 27, pp. 925-933.

17. Ilmjärvi S., Abdul F., Acosta-Gutiérrez S., Estarellas C., Galdadas I., Casimir M., Alessandrini M., Gervasio F.L., Krause K.-H. Concurrent mutations in RNA-dependent RNA polymerase and spike protein emerged as the epidemiologically most successful SARS-CoV-2 variant. *Sci. Rep.*, 2021, Vol. 11, 13705. doi: 10.1038/s41598-021-91662-w.
18. Jean S., Lee I., Hsueh R. Treatment options for COVID-19: the reality and challenges. *J. Microbiol. Immunol. Infect.*, 2020, Vol. 53, pp. 436-443.
19. Kumar Y., Singh H., Patel C.N. In silico prediction of potential inhibitors for the main protease of SARS-CoV-2 using molecular docking and dynamics simulation based drug-repurposing. *J. Infect. Public Health*, 2020, Vol. 13, pp. 1210-1223.
20. Mari A., Roloff T., Stange M., Søgaaard K.K., Asllanaj E., Tauriello G., Alexander L.T., Schweitzer M., Leuzinger K., Gensch A., Martinez A.E., Bielicki J., Pargger H., Siegemund M., Nickel C.H., Bingisser R., Osthoff M., Bassetti S., Sendi P., Battegay M., Marzolini C., Seth-Smith H.M.B., Schwede T., Hirsch H.H., Egli A. Global genomic analysis of SARS-CoV-2 RNA dependent RNA polymerase evolution and antiviral drug resistance. *Microorganisms*, 2021, Vol. 9, no. 5, 1094. doi: 10.3390/microorganisms9051094.
21. Nguyen H., Thai N., Truong D., Li M. Remdesivir Strongly Binds to Both RNA-Dependent RNA polymerase and Main Protease of SARS-CoV-2: Evidence from Molecular Simulations. *J. Phys. Chem.*, 2020, Vol. 124, pp. 11337-11348.
22. Pachetti M., Marini B., Benedetti F., Giudici F., Mauro E., Storici P., Masciovecchio C., Angeletti S., Ciccozzi M., Gallo R.C., Zella D., Ippodrino R. Emerging SARS-CoV-2 mutation hot spots include a novel RNA-dependent-RNA polymerase variant. *J. Transl. Med.*, 2020, Vol. 18, no. 1, 179. doi.org/10.1186/s12967-020-02344-6.
23. Sada M., Saraya T., Ishii H., Okayama K., Hayashi Y., Tsugawa T., Nishina A., Murakami K., Kuroda M., Ryo A., Kimura H. Detailed molecular interactions of favipiravir with SARS-CoV-2, SARS-CoV, MERS-CoV, and influenza virus polymerases in silico. *Microorganisms*, 2020, Vol. 8, no. 10, 1610. doi: 10.3390/microorganisms8101610.
24. Salleh M.Z., Derrick J.P., Deris Z.Z. Structural evaluation of the spike glycoprotein variants on SARS-CoV-2 transmission and immune evasion. *Inter. J. Mol. Sci.*, 2021, Vol. 22, no. 14, 7425. doi.org/10.3390/ijms22147425.
25. Senger M.R., Evangelista T.C.S., Dantas R.F., Santana M.V.D.S., Gonçalves L.C.S., de Souza Neto L.R., Ferreira S.B., Silva-Junior F.P. COVID-19: molecular targets, drug repurposing and new avenues for drug discovery. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 2020, Vol. 115, e200254. doi: 10.1590/0074-02760200254.
26. Shaeen A., Sattar N., Ibrahim M., Irfan M. Role of Remdesivir in COVID-19. *Aus. J. Pulm. Res. Med.*, 2021, Vol. 8, no. 1, 1071.
27. Sheahan T.P., Sims A.C., Leist S.R., Schafer A., Won J. Comparative therapeutic efficacy of remdesivir and combination lopinavir, ritonavir, and interferon beta against MERS-CoV. *Nat. Commun.*, 2020, Vol. 11, no. 1, 222. doi: 10.1038/s41467-019-13940-6.
28. Shehroz M., Zaheer T., Hussain T. Computer-aided drug design against spike glycoprotein of SARS-CoV-2 to aid COVID-19 treatment. *Heliyon*, 2020, Vol. 6, no. 10, e05278. doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e05278.
29. Showers W., Leach S., Kechris K., Strong M. Analysis of SARS-CoV-2 Mutations over time reveals increasing prevalence of variants in the spike protein and RNA-dependent RNA polymerase. *bioRxiv*, 2021. doi: 10.1101/2021.03.05.433666.
30. Sun C., Zhang J., Wei J., Zheng X., Zhao X., Fang Z., Xu D., Yuan H., Liu Y. Screening, simulation, and optimization design of small molecule inhibitors of the SARS-CoV-2 spike glycoprotein. *PLoS One*, 2021, Vol. 16, no. 1, e0245975. doi: 10.1371/journal.pone.0245975.
31. Walls C., Park Y.-J., Tortorici A., Wall A., McGuire T., Veasler D. Structure, function, and antigenicity of the SARS-CoV-2 spike glycoprotein. *Cell*, 2020, Vol. 181, pp. 281.e6-292.e6.
32. Wang M., Cao R., Zhang L., Yang X., Liu J., Xu M., Shi Z., Hu Z., Zhong W., Xiao G. Remdesivir and chloroquine effectively inhibit the recently emerged novel coronavirus (2019-nCoV) in vitro. *Cell Res.*, 2020, Vol. 30, pp. 269-271.
33. Williamson B.N., Feldmann F., Schwarz B., Meade-White K., Porter D.P., Schulz J., van Doremalen N., Leighton I., Yinda C.K., Pérez-Pérez L., Okumura A., Lovaglio J., Hanley P.W., Saturday G., Bosio C.M., Anzick S., Barbican K., Cihlar T., Martens C., Scott D.P., Munster V.J., de Wit E. Clinical benefit of remdesivir in rhesus macaques infected with SARS-CoV-19. *Nature*, 2020, Vol. 585, pp. 273-276.
34. Wu A., Peng Y., Huang B., Ding X., Wang X., Niu P., Meng J., Zhu Z., Zhang Z., Wang J., Sheng J., Quan L., Xia Z., Tan W., Cheng G., Jiang T. Genome composition and divergence of the novel coronavirus (2019-nCoV) originating in China. *Cell Host Microbe*, 2020, Vol. 27, pp. 325-328.
35. Wu C., Chen X., Cai Y., Xia J., Zhou X. Risk factors associated with acute respiratory distress syndrome and death in patients with coronavirus disease 2019 pneumonia in Wuhan, China. *JAMA Intern. Med.*, 2020, Vol. 180, no. 7, pp. 1-11.
36. Yin W., Mao C., Luan X., Shen D.-D., Shen Q., Su H., Wang X., Zhou F., Zhao W., Gao M., Chang S., Xie Y.C., Tian G., Jiang H.-W., Tao S.-C., Shen J., Jiang Y., Jiang H., Xu Y., Zhang S., Zhang Y., Xu H.E. Structural basis for inhibition of the RNA-dependent RNA polymerase from SARS-CoV-2 by remdesivir. *Science*, 2020, Vol. 368, pp. 1499-1504.
37. Yurkovetskiy L., Wang X., Pascal K.E., Tomkins-Tinch C., Nyalile T.P., Wang Y., Baum A., Diehl W.E., Dauphin A., Carbone C., Veinotte K., Egri S.B., Schaffner S.F., Lemieux J.E., Munro J.B., Rafique A., Barve A.,

Sabeti P.C., Kyratsous C.A., Dudkina N.V., Shen K., Luban J. Structural and functional analysis of the D614G SARS-CoV-2 spike protein variant. *Cell*, 2020, Vol. 183, pp. 739-751.e8.

38. Zhang Q., Xiang R., Huo S., Zhou Y., Jiang S., Wang Q., Yu F. Molecular mechanism of interaction between SARS-CoV-2 and host cells and interventional therapy. *Sig. Transduct. Target. Ther.*, 2021, Vol. 6, no. 1, 233. doi: 10.1038/s41392-021-00653-w.

39. Zhu N., Zhang D., Wang W., Li X., Yang B., Song J., Zhao X., Huang B., Shi W., Lu R., Niu P., Zhan F., Ma X., Wang D., Xu W., Wu G., Gao G.F., Tan W. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. *N. Engl. J. Med.*, 2020, Vol. 382, pp. 727-733.

Автор:

Али А. Давуд — к.микробиол.н., лектор, кафедра анатомии Медицинского колледжа Мосульского университета, г. Мосул, Ирак

Author:

Ali A. Dawood, PhD (Microbiology), Lector, Department of Anatomy, College of Medicine, University of Mosul, Mosul, Iraq

Поступила 16.03.2022
Принята к печати 30.03.2022

Received 16.03.2022
Accepted 30.03.2022

МЕХАНИЗМЫ ФОРМИРОВАНИЯ ГИБРИДНОГО ИММУНИТЕТА У ЛИЦ, ПЕРЕБОЛЕВШИХ COVID-19 И ВАКЦИНИРОВАННЫХ ПЕПТИДНЫМИ АНТИГЕНАМИ SARS-CoV-2

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. Актуальность текущей эпидемической ситуации новой коронавирусной инфекции определяется новыми штаммами вируса и регистрацией фактов повторного инфицирования у перенесших COVID-19 ранее. В этой связи вопросы о целесообразности и характере вакцинации переболевших обращают на себя пристальное внимание, что, в том числе, отразилось на формировании понятия «гибридный иммунитет». Целью настоящего исследования стал анализ изменений параметров иммунной системы, отражающих их регуляторный и функциональный потенциал, в ответ на введение пептидной вакцины «ЭпиВакКорона» лицам, перенесшим новую коронавирусную инфекцию. Для изучения особенностей формирования гибридного иммунитета проведен ретроспективный анализ наблюдения за 43 участниками исследования. Критериями включения служили данные, подтверждающие COVID-19 в легком и среднетяжелом вариантах течения в периоде от полугода до года назад, низкий уровень либо отсутствие антител к нуклеокапсидному белку SARS-CoV-2, отрицательный результат ПЦР на наличие вируса SARS-CoV-2, отсутствие коморбидной патологии. Методом проточной цитофлюориметрии с использованием соответствующего целям набора моноклональных антител определяли субпопуляционный состав, регуляторный и функциональный потенциал иммунной системы. Через 21 день после введения первой дозы «ЭпиВакКороны» у всех участников исследования регистрировались антитела к пептидным антигенам вакцины в максимально высоких для используемой тест-системы SARS-CoV-2-IgG-Вектор значениях коэффициента позитивности. Помимо этого, отмечен четырехкратный рост количества специфических IgG к N-белку. Специфический иммунный ответ на рекомбинантные антигены SARS-CoV-2 сопровождался снижением в циркуляции количества моноцитов, экспрессирующих TLR4, Т-хелперов, экспрессирующих корецептор взаимо-

Адрес для переписки:

Андреева Ирина Ивановна
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:

Andreeva Irina I.
Rostov State Medical University
344022, Russian Federation, Rostov-on-Don,
Nakhichevan 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 «Механизмы формирования гибридного иммунитета у лиц, переболевших COVID-19 и вакцинированных пептидными антигенами SARS-CoV-2» // Медицинская иммунология, 2022. Т. 24, № 3. С. 629-640. doi: 10.15789/1563-0625-MOF-2490
© 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 "Mechanisms of formation of hybrid immunity in people who recovered from COVID-19 and were vaccinated with SARS-CoV-2 peptide antigens", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2022, Vol. 24, no. 3, pp. 629-640. doi: 10.15789/1563-0625-MOF-2490
DOI: 10.15789/1563-0625-MOF-2490

действия с антигенпредставляющими клетками, непереключенных В-памяти при увеличении числа В-лимфоцитов, экспрессирующих молекулу Т-В корецепторного взаимодействия CD40. Остальные отличия функционирования иммунной системы, выявленные у переболевших COVID-19 до вакцинации в сравнении с контрольными данными, не претерпели изменений и состоят в снижении доли моноцитов, экспрессирующих HLA-DR, повышении экспрессии на Т- и В-лимфоцитах молекул межклеточной кооперации, увеличении количества Treg, B1-клеток, активированных В-лимфоцитов при снижении доли супрессорных В-reg и В-памяти. Совокупность представленных данных демонстрирует, что предшествовавшая вакцинации инфекция COVID-19 при легком и среднетяжелом вариантах клинического течения способствует формированию иммунологической памяти и обеспечивает возможность формирования вторичного иммунного ответа даже на однократное введение пептидных антигенов вируса SARS-CoV-2.

Ключевые слова: COVID-19, поствакцинальный иммунитет, постинфекционный иммунитет, ЭпиВак Корона

MECHANISMS OF FORMATION OF HYBRID IMMUNITY IN PEOPLE WHO RECOVERED FROM COVID-19 AND WERE VACCINATED WITH SARS-CoV-2 PEPTIDE ANTIGENS

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 relevance of the current epidemic situation of a new coronavirus infection is determined by new strains of the virus and the registration of cases of re-infection in COVID-19 survivors earlier. In this regard, the questions about the expediency and nature of vaccination of those who have been ill attract close attention, moreover it has affected the formation of the concept of “hybrid immunity”. The aim of this study was to analyze changes in the parameters of the immune system, reflecting their regulatory and functional potential, in response to the introduction of the peptide vaccine EpiVacCorona to persons who have suffered from the new coronavirus infection. To study the features of the formation of hybrid immunity, a retrospective analysis of the observation of 43 study participants was carried out. The inclusion criteria were data confirming COVID-19 in mild and moderate forms of the course in the period from six months to a year ago, a low level or absence of antibodies to the nucleocapsid protein SARS-CoV-2, a negative PCR result for the presence of the SARS-CoV-2 virus, the absence of comorbid pathology. The subpopulation composition, regulatory and functional potential of the immune system were determined by flow cytometry using a set of monoclonal antibodies corresponding to the goals. 21 days after the administration of a single dose of EpiVacCorona, antibodies to the vaccine peptide antigens were registered in all study participants at the highest coefficient of positivity values for the SARS-CoV-2-IgG-Vector test system used. In addition, there was a fourfold increase in the number of specific IgG to the N protein. A specific immune response to recombinant SARS-CoV-2 antigens was accompanied by a decrease in the circulation of the number of monocytes expressing TLR4, T helper cells expressing the interaction coreceptor with antigen-presenting cells, unconnected B memory with an increase in the number of B lymphocytes expressing the CD40 T-B coreceptor interaction molecule. The remaining differences in the functioning of the immune system identified in patients with COVID-19 before the vaccination in comparison with the control data have not changed. The differences consist in a decrease in the proportion of monocytes expressing HLA-DR, an increase in the expression of interaction molecules on T and B lymphocytes, an increase in the number of Treg, B1 cells, activated B lymphocytes with a decrease in the proportion of suppressor Breg and B memory. The totality of the presented data demonstrates that the COVID-19 infection that preceded vaccination in mild and moderate clinical course contributes to the formation of immunological memory, which made it possible to form a secondary immune response even to a single injection of peptide antigens of the virus.

Keywords: COVID-19, post-vaccination immunity, post-infectious immunity, EpiVacCorona vaccine

Введение

Развивающаяся пандемия COVID-19 полагает необходимость формирования и поддержания коллективного иммунитета к SARS-CoV-2 [1, 2, 4, 7, 8, 9, 14]. Эпидемическая ситуация сегодняшнего дня, определяемая новыми штаммами вируса, все более частая регистрация фактов повторного инфицирования у лиц, перенесших COVID-19 ранее, актуализирует проблему вакцинации переболевших. В силу этого механизмы формирования «гибридного иммунитета», сочетающего постинфекционный и поствакцинальный иммунный ответ, становится объектом пристального внимания исследователей [3, 10, 13, 18]. Опубликованные работы демонстрируют выраженные иммунные реакции на S-белок, индуцированные mRNA или аденовекторными вакцинами у переболевших COVID-19, что объяснимо для вакцин такого рода [11, 16, 20]. В то же время изучение иммуногенных эффектов пептидных фрагментов структурных белков вируса в условиях сформированного постинфекционного иммунитета представляет несомненный интерес [5, 6].

Цель — изучить динамику параметров иммунной системы на введение вакцины «ЭпиВакКорона» у лиц, перенесших новую коронавирусную инфекцию.

Материалы и методы

Участники исследования

Представлены данные ретроспективного анализа наблюдения за 43 переболевшими новой коронавирусной инфекцией, получившими первую дозу (V1) «ЭпиВакКорона». Критериями включения в группу служила медицинская документация, подтверждающая COVID-19 в анамнезе, отсутствие либо низкий уровень антител к нуклеокапсидному белку SARS-CoV-2, отрицательный результат ПЦР на наличие вируса SARS-CoV-2, отсутствие коморбидной патологии. Участники исследования перенесли COVID-19 в легком (33 чел) и среднетяжелом (10 чел) вариантах течения в интервале от 6 до 12 мес. Средний возраст составил 42 года (35-52), мужчин — 11, женщин — 32. Все пациенты подписывали добровольное информированное согласие на участие в исследовании в соответствии с протоколом, одобренным Локальным независимым этическим комитетом ФГБОУ ВО РостГМУ (протокол 10/21 от 20.05.2021).

При проведении исследования использована пептидная вакцина против COVID-19 «ЭпиВакКорона», состоящая из консервативных эпитопов S-белка, конъюгированных с носителем, представленным фрагментом N-белка SARS-

CoV-2, адсорбированных на гидроксиде алюминия (регистрационный номер ЛП-006504). Вакцину вводили в соответствии с инструкцией внутримышечно в дозе 0,5 мл однократно.

Лабораторные исследования

Для характеристики специфического иммунного ответа к SARS-CoV-2 использовали ИФА тест-системы производства ФБУН НИИЭМ им. Пастера с определением количества IgG антител к нуклеокапсидному белку SARS-CoV-2 (N-CoV-2-IgG PS, регистрационное удостоверение № РЗН 2021/14085 от 14.04.2021 г.), ИФА тест-системы производства ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора с полуколичественной оценкой (КП) антител к компонентам «ЭпиВакКорона» (SARS-CoV-2-IgG-Вектор, регистрационное удостоверение РЗН 2020/12952 от 10.12.2020). Непосредственно перед вакцинацией и на 21-й день после проводили исследование биологического материала 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. Метод проточной цитофлуориметрии (с использованием прибора Cytoomics FC 500, США) применяли для оценки количественных и функциональных показателей лимфоцитов и моноцитов периферического кровотока. В работе были использованы диагностические моноклональные антитела с различным набором цветных меток: CD19-PE/CD5-FITC; CD19-FITC/CD25-PE; CD19-PE/CD23-FITC; CD19-PE/CD27-FITC; CD19-PC/CD27-PE/IgD-FITC; CD19-FITC/CD40-PE; CD19-FITC/CD86-PE; CD19-PE/CD38-FITC/CD24-PC; CD3-PE/CD45R0-FITC; CD3-PE/HLADR-FITC; CD4-PE/CD25-FITC; CD4-PE/CD25-PC/FoxP3-FITC; CD4-PE/CD28-FITC; CD4-FITC/CD154-PE; CD8-FITC/GrB-PE; CD8-PE/CD28-FITC; CD16-FITC/GrPE; CD14-PE/HLADR-FITC; CD14-PE/CD284-FITC (Beckman Coulter, США). Общий уровень сывороточных иммуноглобулинов оценивали методом радиальной иммунодиффузии в геле. Периферическую кровь для оценки параметров иммунного статуса забирали в день вакцинации до инокуляции первой дозы и через 21 день после. В качестве контрольной группы обследовано 20 доноров крови, не имевших клинических, анамнестических и лабораторных данных о перенесенной SARS-CoV-2-инфекции.

Статистический анализ

Использовалась программа Statistica SPSS 26.0 (IBM Statistic, США). Количественные данные оценивались на предмет соответствия нормальному закону распределения (НЗР) с помощью критерия Шапиро–Уилка. Ввиду того, что вы-

борки не подчиняются НЗР, использовали непараметрический критерий сравнительного анализа Манна–Уитни, количественные представлены с помощью медианы (Me) и нижнего и верхнего квартилей ($Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$). Различия между данными в разные периоды исследования считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

Результаты

Анализ параметров специфического гуморального ответа на SARS-CoV-2 до вакцинации

у всех участников исследования документировал наличие постинфекционных антител к N-белку в диапазоне 97,05 (45,78–145,95) у.е./мл. Эти результаты, наряду с анамнестическими данными и медицинской документацией, стали подтверждением перенесенной инфекции и основанием для детального анализа показателей врожденного и адаптивного иммунитета у переболевших новой коронавирусной инфекцией перед проведением вакцинации в сравнении с контрольными данными доноров крови (табл. 1, 2).

ТАБЛИЦА 1. ПАРАМЕТРЫ КЛЕТОЧНОГО ЗВЕНА ИММУННОЙ СИСТЕМЫ У ЛИЦ, ПЕРЕНЕСШИХ НОВУЮ КОРОНАВИРУСНУЮ ИНФЕКЦИЮ ДО ВВЕДЕНИЯ «ЭпиВакКорона»

TABLE 1. PARAMETERS OF THE CELLULAR IMMUNITY IN PERSONS WHO HAVE SUFFERED FROM THE NEW CORONAVIRUS INFECTION BEFORE THE INTRODUCTION OF THE EpiVacCorona VACCINE

Показатель Indicator	Доноры Donors	До вакцинации Before vaccination	p
CD16 ⁺ , %	11,0 (10,0–15,0)	13 (9,8–18,3)	0,138
CD16 ⁺ , abs.	0,21 (0,19–0,29)	0,21 (0,16–0,39)	0,976
CD14 ⁺ HLA-DR ⁺ , %	72,0 (62,0–80,0)	50,0 (39,7–57,5)	0,001*
CD14 ⁺ HLA-DR ⁺ , abs.	0,26 (0,22–0,29)	0,18 (0,12–0,21)	0,04*
CD14 ⁺ CD284 ⁺ , %	30,0 (23,0–40,0)	39,5 (30,0–50,7)	0,001*
CD14 ⁺ CD284 ⁺ , abs.	0,11 (0,08–0,14)	0,14 (0,09–0,25)	0,039*
CD3 ⁺ , %	75,0 (72,0–77,0)	79,0 (74,20–80,75)	0,344
CD3 ⁺ , abs.	1,44 (1,38–1,48)	1,26 (1,00–1,63)	0,382
CD3 ⁺ CD45RA ⁺ , %	25,0 (19,0–32,0)	28,2 (23,2–34,2)	0,128
CD3 ⁺ CD45RA ⁺ , abs.	0,48 (0,36–0,61)	0,43 (0,32–0,61)	1
CD3 ⁺ CD45R0 ⁺ , %	17,3 (13–21)	19,0 (13,0–23,9)	0,459
CD3 ⁺ CD45R0 ⁺ , abs.	0,33 (0,25–0,40)	0,32 (0,15–0,45)	0,641
CD3 ⁺ HLA-DR ⁺ , %	1,25 (0,92–1,80)	1,45 (0,92–1,95)	0,014*
CD3 ⁺ HLA-DR ⁺ , abs.	0,037 (0,033–0,040)	0,032 (0,02–0,03)	0,06
CD4 ⁺ , %	45,0 (38,0–47,0)	48 (42,5–54,7)	0,243
CD4 ⁺ , abs.	0,73 (0,65–0,94)	0,82 (0,64–1,00)	0,1
CD4 ⁺ CD25 ⁺ FoxP3 ⁺ , %	1,8 (1,3–2,5)	2,42 (2,00–2,89)	0,003*
CD4 ⁺ CD25 ⁺ FoxP3 ⁺ , abs.	0,03 (0,02–0,05)	0,05 (0,04–0,06)	0,002*
CD4 ⁺ CD28 ⁺ , %	28,0 (21,0–30,0)	30,0 (18,2–36,0)	0,451
CD4 ⁺ CD28 ⁺ , abs.	0,53 (0,40–0,57)	0,52 (0,25–0,70)	0,81
CD4 ⁺ CD40L ⁺ , %	0,5 (0,3–0,9)	0,85 (0,47–1,27)	0,003*
CD4 ⁺ CD40L ⁺ , abs.	0,01 (0,003–0,015)	0,02 (0,010–0,024)	0,04*
CD8 ⁺ , %	24,0 (20,0–28,0)	29,0 (23,0–35,0)	0,001*
CD8 ⁺ , abs.	0,50 (0,46–0,54)	0,50 (0,34–0,65)	0,252
CD8 ⁺ Gr ⁺ , %	13,5 (11,5–15,2)	14,5 (10,5–20,8)	0,325
CD8 ⁺ Gr ⁺ , abs.	0,26 (0,22–0,29)	0,22 (0,14–0,40)	0,576
CD8 ⁺ CD28 ⁺ , %	14,0 (10,0–17,0)	23,0 (17,7–27,0)	0,001*
CD8 ⁺ CD28 ⁺ , abs.	0,27 (0,19–0,32)	0,38 (0,21–0,53)	0,001*

Примечание. * – различия статистически значимы при $p < 0,05$ согласно U-критерию Манна–Уитни.

Note. *, the differences are statistically significant at $p < 0.05$ according to the Mann–Whitney U test.

Выявлено, что в исследуемых параметрах врожденного ответа не соответствовали контрольным значениям данные моноцитарного ряда. Отмечено снижение числа HLA-DR⁺ моноцитов, способных к презентации антигена и повышение количества ответственных за первичное распознавание TLR4⁺ клеток (табл. 1). В Т-клеточном звене адаптивного иммунитета отличия затронули циркулирующие Т-хелперы, несущие молекулу корцепторного взаимодействия

CD40L, число которых превышает контрольные цифры. Также увеличено количество периферических CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺Treg. Отличным от контрольных значений оказался и параметр, характеризующий CD8⁺ субпопуляцию в виде увеличения общего числа и доли дифференцированных Т-эффекторов. Следует отметить и рост количества Т-клеток, экспрессирующих маркер поздней активации (табл. 1).

ТАБЛИЦА 2. ПАРАМЕТРЫ ГУМОРАЛЬНОГО ЗВЕНА АДАПТИВНОГО ИММУНИТЕТА У ЛИЦ, ПЕРЕНЕСШИХ НОВУЮ КОРОНАВИРУСНУЮ ИНФЕКЦИЮ ДО ВВЕДЕНИЯ «ЭпиВакКороны»

TABLE 2. PARAMETERS OF THE HUMORAL IMMUNITY IN PERSONS WHO HAVE SUFFERED FROM THE NEW CORONAVIRUS INFECTION BEFORE THE INTRODUCTION OF THE EpiVacCorona VACCINE

Показатель Indicator	Доноры Donors	До вакцинации Before vaccination	p
CD19 ⁺ , %	8,0 (5,0-10,0)	7 (6-10)	0,129
CD19 ⁺ , abs.	0,15 (0,10-0,19)	0,13 (0,09-0,18)	0,217
CD19 ⁺ CD5 ⁺ , %	7,7 (4,5-9,5)	6,6 (5,2-9,6)	0,107
CD19 ⁺ CD5 ⁺ , abs.	0,15 (0,09-0,19)	0,13 (0,08-0,17)	0,073
CD19 ⁺ CD5 ⁺ , %	0,2 (0,1-0,3)	0,6 (0,4-0,8)	0,001*
CD19 ⁺ CD5 ⁺ , abs.	0,004 (0,002-0,006)	0,01 (0,006-0,017)	0,001*
B1:B2	38 (45-32)	11 (7-23)	0,001*
CD19 ⁺ CD23 ⁺ , %	0,91 (0,7-1,1)	1,5 (0,7-2,7)	0,008*
CD19 ⁺ CD23 ⁺ , abs.	0,017 (0,013-0,021)	0,024 (0,01-0,04)	0,022*
CD19 ⁺ CD25 ⁺ , %	0,05 (0,04-0,06)	0,35 (0,2-0,6)	0,001*
CD19 ⁺ CD25 ⁺ , abs.	0,001 (0,0008-0,0010)	0,0057 (0,002-0,010)	0,001*
CD19 ⁺ CD38 ⁺ CD24 ⁺ , %	0,82 (0,60-1,04)	0,40 (0,16-0,52)	0,001*
CD19 ⁺ CD38 ⁺ CD24 ⁺ , abs.	0,015 (0,011-0,020)	0,007 (0,003-0,009)	0,001*
CD19 ⁺ CD27 ⁺ , %	5,7 (5,1-6,1)	5,7 (4,5-7,4)	0,723
CD19 ⁺ CD27 ⁺ , abs.	0,10 (0,098-0,117)	0,1 (0,067-0,131)	0,598
CD19 ⁺ CD27 ⁺ , %	2,27 (1,91-2,61)	1,55 (1,30-2,92)	0,012*
CD19 ⁺ CD27 ⁺ , abs.	0,027(0,017-0,050)	0,025 (0,019-0,040)	0,598
CD19 ⁺ CD27 ⁺ IgD ⁺ , %	1,15 (1,04-1,31)	0,48 (0,25-0,92)	0,001*
CD19 ⁺ CD27 ⁺ IgD ⁺ , abs.	0,023 (0,020-0,025)	0,01 (0,004-0,016)	0,001*
CD19 ⁺ CD27 ⁺ IgD ⁺ , %	1,07 (0,86-1,29)	1,07 (0,65-1,70)	0,994
CD19 ⁺ CD27 ⁺ IgD ⁺ , abs.	0,020 (0,016-0,025)	0,019 (0,009-0,030)	0,358
CD19 ⁺ CD40 ⁺ , %	7,02 (6,61-7,45)	6,0 (4,1-9,0)	0,11
CD19 ⁺ CD40 ⁺ , abs.	0,13 (0,12-0,14)	0,1 (0,06-0,15)	0,11
CD19 ⁺ CD86 ⁺ , %	0,13 (0,11-0,15)	0,6 (0,4-0,8)	0,001*
CD19 ⁺ CD86 ⁺ , abs.	0,0025 (0,002-0,003)	0,008 (0,005-0,016)	0,001*
IgA г/л IgA g/l	1,7 (1,3-1,9)	1,9 (1,48-2,15)	0,033*
IgM г/л IgM g/l	1,1 (0,9-1,3)	1,18 (1,05-1,32)	0,06
IgG г/л IgG g/l	11 (10-12)	12 (11,5-12,6)	0,001*

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. As for Table 1.

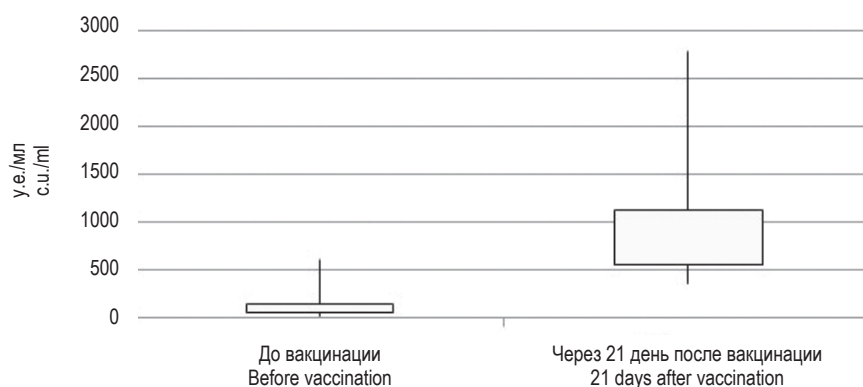


Рисунок 1. Уровень IgG-антител к N-белку в сыворотке крови переболевших COVID-19 до и через три недели после вакцинации

Figure 1. Anti-N protein IgG serum level in recovered COVID-19 patients before and three weeks after vaccination

В показателях гуморального адаптивного иммунитета показано увеличение в кровотоке числа В1-лимфоцитов и, соответственно, изменение соотношения В1:В2, рост количества В-клеток, экспрессирующих активационные рецепторы CD25 и CD23, снижение общего числа В-памяти за счет фенотипического варианта непереклоченных клеток, значительное усиление экспрессии молекулы корцепторного взаимодействия CD86 при выраженном снижении числа супрессорных CD19⁺CD38⁺CD24⁺В-лимфоцитов. Также следует отметить повышение, в сравнении с контрольными показателями, уровня сывороточных IgA и IgG (табл. 2).

Через 21 день после введения одной дозы «ЭпиВакКороны» у всех участников исследования регистрировались специфические антитела к пептидным антигенам вакцины при средних значениях КП 17,2 (16,69-17,42) в ИФА-тест системе SARS-CoV-2-IgG-Вектор. Ввиду того, что крите-

рием отбора в исследуемую группу было отсутствие либо низкие значения постинфекционного уровня антител к нуклеокапсиду SARS-CoV-2, учитывая присутствие N-белка в составе вакцины наряду с общей характеристикой поствакцинального ответа нами был проведен анализ уровня N-IgG. Установлено, что медиана этого показателя составила 664,7 (556,78-1122,25) у.е./мл. Динамика вторичного ответа на соответствующий компонент «ЭпиВакКороны» представлен на рисунке 1.

Факт регистрации выраженного специфического гуморального ответа на вакцину у переболевших COVID-19 послужил поводом детального анализа динамики показателей иммунной системы. Сопоставление полученных результатов позволило выявить статистически значимые различия показателей после вакцинации в сравнении с исходом (табл. 3).

ТАБЛИЦА 3. ДИНАМИКА ПАРАМЕТРОВ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ ДО И ЧЕРЕЗ ТРИ НЕДЕЛИ ПОСЛЕ ВВЕДЕНИЯ ВАКЦИНЫ «ЭпиВакКорона» У ЛИЦ, ПЕРЕНЕСШИХ НОВУЮ КОРОНАВИРУСНУЮ ИНФЕКЦИЮ

TABLE 3. DYNAMICS OF THE IMMUNE SYSTEM PARAMETERS BEFORE AND THREE WEEKS AFTER THE INTRODUCTION OF THE EpiVacCorona VACCINE IN PERSONS WHO HAVE SUFFERED FROM THE NEW CORONAVIRUS INFECTION

Показатель Indicator	До вакцинации Before vaccination	Через 3 недели Three weeks after vaccination	p
CD14 ⁺ CD284 ⁺ , %	39,5 (30,0-50,7)	28 (23,0-44,8)	0,028*
CD14 ⁺ CD284 ⁺ , abs.	0,14 (0,09-0,25)	0,11 (0,07-0,14)	0,032*
CD4 ⁺ CD28 ⁺ , %	30,0 (18,2-36,0)	23,0 (16,0-28,0)	0,016*
CD4 ⁺ CD28 ⁺ , abs.	0,52 (0,25-0,70)	0,38 (0,24-0,55)	0,097*
CD19 ⁺ CD27 ⁺ IgD ⁺ , %	0,48 (0,25-0,92)	0,31 (0,11-0,61)	0,019*
CD19 ⁺ CD27 ⁺ IgD ⁺ , abs.	0,01 (0,004-0,016)	0,005 (0,002-0,011)	0,0001*
CD19 ⁺ CD40 ⁺ , %	6,0 (4,1-9,0)	7,5 (5,3-9,8)	0,028*
CD19 ⁺ CD40 ⁺ , abs.	0,1 (0,06-0,15)	0,13 (0,04-0,20)	0,0001*

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. As for Table 1.

ТАБЛИЦА 4. ДИНАМИКА ПАРАМЕТРОВ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ, ОТЛИЧНЫХ ОТ КОНТРОЛЬНЫХ ЗНАЧЕНИЙ, ДО И ЧЕРЕЗ ТРИ НЕДЕЛИ ПОСЛЕ ВВЕДЕНИЯ «ЭпиВакКороны», У ЛИЦ, ПЕРЕНЕСШИХ НОВУЮ КОРОНАВИРУСНУЮ ИНФЕКЦИЮ

TABLE 4. DYNAMICS OF THE IMMUNE SYSTEM PARAMETERS OTHER THAN CONTROL VALUES BEFORE AND THREE WEEKS AFTER THE INTRODUCTION OF THE EpiVacCorona VACCINE IN PERSONS WHO HAVE SUFFERED FROM THE NEW CORONAVIRUS INFECTION

Показатель Indicator	Доноры Donors	До вакцинации Before vaccination	Через 3 недели Three weeks after vaccination	p
CD14 ⁺ HLA-DR ⁺ , %	72,0 (62,0-80,0)	50,0 (39,7-57,5)	41,5 (35-55)	p ₁ = 0,001* p ₂ = 0,001*
CD14 ⁺ HLA-DR ⁺ , abs.	0,26 (0,22-0,29)	0,18 (0,12-0,21)	0,16 (0,11-0,22)	p ₁ = 0,041* p ₂ = 0,001*
CD4 ⁺ CD25 ⁺ FoxP3 ⁺ , %	1,8 (1,3-2,5)	2,42 (2,00-2,89)	2 (1,54-2,65)	p ₁ = 0,003* p ₂ = 0,006*
CD4 ⁺ CD25 ⁺ FoxP3 ⁺ , abs.	0,03 (0,02-0,05)	0,05 (0,04-0,06)	0,04 (0,02-0,06)	p ₁ = 0,002* p ₂ = 0,001*
CD4 ⁺ CD40L ⁺ , %	0,5 (0,3-0,9)	0,85 (0,47-1,27)	0,7 (0,31-1,25)	p ₁ = 0,003* p ₂ = 0,001*
CD4 ⁺ CD40L ⁺ , abs.	0,01 (0,003-0,015)	0,02 (0,010-0,024)	0,02 (0,010-0,026)	p ₁ = 0,04* p ₂ = 0,03*
B1:B2	38 (45-32)	11 (7-23)	11 (7-19)	p ₁ = 0,001* p ₂ = 0,001*
CD19 ⁺ CD38 ⁺ CD24 ⁺ , %	0,82 (0,60-1,04)	0,40 (0,16-0,52)	0,4 (0,25-0,64)	p ₁ = 0,001* p ₂ = 0,001*
CD19 ⁺ CD38 ⁺ CD24 ⁺ , abs.	0,015 (0,011-0,020)	0,007 (0,003-0,009)	0,007 (0,004-0,012)	p ₁ = 0,001* p ₂ = 0,001*
CD19 ⁺ CD27 ⁺ , %	2,27 (1,91-2,61)	1,55 (1,30-2,92)	1,7 (1,2-2,2)	p ₁ = 0,012* p ₂ = 0,001*
CD19 ⁺ CD27 ⁺ , abs.	0,027 (0,017-0,050)	0,025 (0,019-0,040)	0,022 (0,012-0,040)	p ₁ = 0,517 p ₂ = 0,498
CD19 ⁺ CD86 ⁺ , %	0,13 (0,11-0,15)	0,6 (0,4-0,8)	0,7 (0,3-0,9)	p ₁ = 0,001* p ₂ = 0,001*
CD19 ⁺ CD86 ⁺ , abs.	0,0025 (0,002-0,003)	0,008 (0,005-0,016)	0,009 (0,004-0,016)	p ₁ = 0,001* p ₂ = 0,001*

Примечание. * – различия статистически значимы при $p < 0,05$ согласно U-критерию Манна–Уитни. p₁ – уровень значимости при сравнении исследуемых исходных значений параметра и контрольных значений параметра, p₂ – уровень значимости при сравнении исследуемых значений параметра (через 3 недели) и контрольных значений параметра.

Note. *, the differences are statistically significant at $p < 0.05$ according to the Mann–Whitney U test. p₁, the level of significance when comparing the initial and control values of the parameter; p₂, the level of significance when comparing the studied (after 3 weeks) and control values of the parameter.

Через три недели после введения «ЭпиВак-Короны» статически значимо снизилось количество циркулирующих TLR-4⁺ клеток моноцитарного ряда, CD4⁺CD28⁺T-хелперов, экспрессирующих корецептор взаимодействия с АПК, CD19⁺CD27⁺IgD⁺ непереключенных В-памяти при увеличении количества В-лимфоцитов, экспрессирующих молекулу Т-В корецепторного взаимодействия CD40 (табл. 3).

В силу того, что уже при первичной оценке параметров иммунной системы, до вакцинации, в группе наблюдения были зарегистрированы отличия от физиологически значимых контрольных значений, представляет интерес сопоставление динамики и значимости этих отличий в процессе формирования гибридного иммунитета (табл. 4).

Обращает внимание стабильность изменений, описанных до вакцинации, по-прежнему фиксируется снижение антигенпредставляющей способности моноцитов, увеличение количества Treg и снижение супрессивных В-лимфоцитов, перераспределение соотношения B1 и B2, уменьшение в циркуляции В-памяти на фоне усиления экспрессии рецепторов межклеточной кооперации (табл. 4)

Обсуждение

Полученные данные убедительно демонстрируют, что предшествовавшая вакцинации инфекция COVID-19 способствовала перестройке иммунной системы, обеспечившей возможность сформировать вторичный иммунный ответ на пептидные антигены SARS-CoV-2. Этот факт нашел свое подтверждение выраженным специфическим иммунным ответом не только на все компоненты «ЭпиВак-Корона», но и отдельно на один из составляющих — N-белок вируса. В нашем исследовании этот постулат доказан регистрацией через 21 день после вакцинации IgG-антител при значениях КП в диапазоне 16–18 у.е. в тест-системе SARS-CoV-2-IgG-Вектор и семикратным количественным ростом IgG к N-белку (ИФА тест-система N-CoV-2-IgG PS). Включение механизмов иммунологической памяти нашло свое отражение в динамике показателей, статистически значимо изменившихся за три недели развития вторичного иммунного ответа. Так, снижение количества CD3⁺CD4⁺CD28⁺T-клеток, участвующих в восприятии антигенного стимула от АПК сопряжено с повышением в периферической циркуляции CD40⁺B-клеток, обеспечивающих процессы Т-В межклеточной кооперации при уменьшении числа циркулирующих В-памяти с непереключенным изотипом CD19⁺CD27⁺IgD⁺. Перечисленные факты отражают вовлеченность во вторичный иммунный ответ обоих звеньев адаптивных реакций, достаточно четкую их сопряженность, согласованность с имеющимися данными о механизмах развития иммунного ответа на SARS-CoV-2 [12, 15, 17, 19]. Наши результаты позволяют предполагать, что в интервале от полугода до одного года продолжительность иммунологической памяти после заражения SARS-CoV-2 сохранена, и даже однократная вакцинация пептидными фрагментами вируса выступает значимым стимулом специфического иммунитета.

Помимо подтверждения, что предшествовавшая инфекция приводит к созданию условий для вторичного иммунного ответа, полученные данные демонстрируют влияние COVID-19 на функционал иммунной системы в целом, что

нами показано при сопоставлении параметров иммунного статуса испытуемых с контрольными цифрами до проведения вакцинации. Более того, отсутствие динамики изменений, зафиксированное через три недели после введения вакцины, свидетельствует о стабильности условий функционирования иммунной системы, возникших после инфекции. Эти изменения затрагивают регуляторный потенциал Т-звена адаптивного иммунитета в виде увеличения Т-лимфоцитов, наделенных супрессорными свойствами, и не только за счет CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺Treg, но и CD3⁺CD8⁺CD28⁻ дифференцированных цитотоксических лимфоцитов. Кроме того, отмечается усиление экспрессии CD154, лиганда контакта с В-клетками. При этом спектр оставленных после COVID-19 изменений В-звена еще более разнообразен и имеет, скорее, обратную, по отношению к Т-системе, направленность. Так, нами показано снижение количества CD19⁺CD38⁺CD24⁺ незрелых переходных В-клеток, которым свойственны супрессорные эффекты, повышение доли активированных CD25⁺ и CD23⁺В-лимфоцитов при весьма значимом усилении экспрессии молекулы корецепторного взаимодействия CD86 и уменьшении количества CD19⁺CD27⁺ клеток с фенотипическим вариантом В-памяти. Более того, у перенесших COVID-19 отмечен существенный рост доли минорной субпопуляции B1, и, соответственно, значимое перераспределение соотношения B1- и B2-лимфоцитов. Изменения отразились и на параметрах врожденного иммунитета в виде снижения антигенпредставляющей активности моноцитов.

Заключение

Новая коронавирусная инфекция при легком и среднетяжелом вариантах клинического течения приводит к изменениям параметров функционирования иммунной системы, регистрируемых через год после инфицирования. Максимальный спектр изменений затрагивает В-звено адаптивного иммунитета. Перестройка иммунного реагирования после COVID-19 обеспечивает высокую иммуногенность даже одной дозы вакцины на основе пептидных антигенов SARS-CoV-2 — «ЭпиВакКорона». Процесс формирования вторичного ответа сопровождается снижением числа циркулирующих CD4⁺T-лимфоцитов, взаимодействующих с антигенпредставляющими клетками при увеличении количества CD40⁺В-лимфоцитов, ответственных за Т-В-кооперацию, и уменьшении доли циркулирующих непереключенных В-клеток памяти.

Список литературы / References

1. Закурская В.Я., Сизьякина Л.П., Харитонов М.В., Шлык С.В. Динамика специфического гуморального ответа у пациентов, перенесших COVID-19 // Иммунология, 2022, Т. 43, № 1. С. 71-77. [Zakurskaya V.Ya., Siziakina L.P., Kharitonova M.V., Shlyk S.V. Dynamics of specific humoral response in COVID-19 patients. *Immunologiya = Immunology*, 2022, Vol. 43, no. 1, pp. 71-77. (In Russ.)]
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., Микаилова О.М., Носков А.К., Носкова Л.Н., Оглезнева Е.Е., Осмоловская Т.П., Пяташина М.А., Пеньковская 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., Istorik 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., Mikailova O.M., Noskov A.K., Noskova L.N., Oglezneva E.E., Osmolovskaya T.P., Patyashina M.A., Penkovskaya N.A., Samoilova L.V., Smirnov V.S., Stepanova T.F., Trotsenko O.E., Totolian 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., Тарасенко А.А., Смоленский В.Ю., Егорова С.А., Смирнов В.С., Дашкевич А.М., Светогор Т.Н., Глинская И.Н., Скуранович А.Л., Миличкина А.М., Дронина А.М., Самойлович Э.О., Хамитова И.В., Семейко Г.В., Амвросьева Т.В., Шмелева Н.П., Рубаник Л.В., Есманчик О.П., Карабан И.А., Дробышевская В.Г., Садовникова Г.В., Шилович М.В., Подушкина Е.А., Кирейчук В.В., Петрова О.А., Бондаренко С.В., Салажкова И.Ф., Ткач Л.М., Шепелевич Л.П., Автухова Н.Л., Иванов В.М., Бабило А.С., Навышная М.В., Беляев Н.Н., Зуева Е.В., Волосарь Л.А., Вербов В.Н., Лихачев И.В., Загорская Т.О., Морозова Н.Ф., Коробова З.Р., Губанова А.В., Тотолян Арег А. Коллективный иммунитет к SARS-CoV-2 населения Республики Беларусь в условиях пандемии COVID-19 // Инфекция и иммунитет, 2021. Т. 11, № 5. С. 887-904. [Popova A.Yu., Tarasenko A.A., Smolenskiy V.Yu., Egorova S.A., Smirnov V.S., Dashkevich A.M., Svetogor T.N., Glinskaya I.N., Skuranovich A.L., Milichkina A.M., Dronina A.M., Samoilovich E.O., Khamitova I.V., Semeiko G.V., Amvrosyeva T.V., Shmeleva N.P., Rubanik L.V., Esmanchik O.P., Karaban I.A., Drobyshevskaya V.G., Sadovnikova G.V., Shilovich M.V., Podushkina E.A., Kireichuk V.V., Petrova O.A., Bondarenko S.V., Salazhkova I.F., Tkach L.M., Shepelevich L.P., Avtukhova N.L., Ivanov V.M., Babilo A.S., Navyshnaya M.V., Belyaev N.N., Zueva E.V., Volosar L.A., Verbov V.N., Likhachev I.V., Zagorskaya T.O., Morozova N.F., Korobova Z.R., Gubanova A.V., Totolian Areg A. Herd immunity to SARS-CoV-2 among the population of the Republic of Belarus amid the COVID-19 pandemic. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2021, Vol. 11, no. 5, pp. 887-904. doi: 10.15789/2220-7619-HIT-1798.
4. 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.Y., 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.
5. 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., Рыднюк Н.Н., Гинько З.И., Петров В.Н., Моисеева А.А., Торжкова П.Ю., Пьянков С.А., Трегубчик Т.В., Антонец 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., Antonec 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. doi: 10.15789/2220-7619-ASB-1699.

6. Сизякина Л.П., Андреева И.И., Харитонов М.В., Зайцева Н.С., Любимов Д.С., Закурская В.Я., Тотолян А.А. Фенотипы поствакцинального иммунитета при использовании вакцины «ЭпиВакКорона» у лиц, перенесших COVID-19 // Медицинская иммунология, 2022. Т. 24, № 2. С. 367-378. [Sizyakina L.P., Andreeva I.I., Kharitonova M.V., Zaitseva N.S., Lyubimov D.S., Zakurskaya V.Y., Totolian A.A. Post-vaccination immunity phenotypes upon usage of EpiVacCorona vaccine in the persons who suffered COVID-19. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2022, Vol. 24, no. 2, pp. 367-378. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-PVI-2457.

7. 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.

8. Buss L.F., Prete C.A. Jr., Abraham C.M.M., Mendrone A. Jr., Salomon T., Almeida-Neto C., França R.F.O., Belotti M.C., Carvalho M.P., Costa A.G., Ferreira S.C., Fraiji N.A., Gurzenda S., Whittaker C., Kamaura L.T., Takecian P.L., Peixoto P., Oikawa M.K., Nishiya A.S., Rocha V., Salles N.A., Santos A.A.S., Silva M.A., Custer B., Parag K.V., Barral-Netto M., Kraemer M.U., Pereira R., Pybus O.G., Busch M.P., Castro M.C., Dye C., Nascimento V.H., Faria N.R., Sabino E.C. Three-quarters attack rate of SARS-CoV-2 in the Brazilian Amazon during a largely unmitigated epidemic. *Science*, 2021, Vol. 371, no. 6526, pp. 288-292.

9. 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.

10. Crotty S. Hybrid immunity. *Science*, 2021, Vol. 372, no. 6549, pp. 1392-1393.

11. 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. 785, pp. 1639-1644.

12. Kudryavtsev I.V., Isakov D.V., Batsunov O.K., Kuznetsova R.N., Rubinstein A.A., Stanevich O.V., Lebedeva A.A., Vorobyov E.A., Vorobyova S.V., Kulikov A.N., Sharapova M.A., Pevtsov D.E., Totolian A.A., Arsentieva N.A., Korobova Z.R., Khamitova I.V. Alterations in B cell and follicular T-helper cell subsets in patients with acute COVID-19 and COVID-19 convalescents. *Current Issues in Molecular Biology*, 2022, Vol. 44, no. 1, pp. 194-205.

13. Pillai S. Suboptimal humoral immunity in Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 infection and viral variant generation. *Clin. Lab. Med.*, 2022, Vol. 42, no. 1, pp. 75-84.

14. Popova A.Y., Ezhlova E.B., Melnikova A.A., Smirnov V.S., Vetrov V.V., Lyalina L.V., Totolian A.A., Andreeva E.E., Babura E.A., Balakhonov S.V., Bashketova N.S., Bugorkova S.A., Bulanov M.V., Valeullina N.N., Goryaev D.V., Detkovskaya T.N., 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 Areg A. SARS-CoV-2 Seroprevalence Structure of the Russian Population during the COVID-19 Pandemic. *Viruses* 2021, Vol. 13, no. 8, 1648. doi: 10.3390/v13081648.

15. Quast I., Tarlinton D. B cell memory: understanding COVID-19. *Immunity*, 2021, Vol. 9, no. 54 (2), pp. 205-210.

16. Reynolds C.J., Pade C., Gibbons J.M., Butler D.K., Otter A.D., Menacho K., Fontana M., Smit A., Sackville-West J.E., Cutino-Moguel T., Maini M.K., Chain B., Noursadeghi M., Brooks T., Semper A., Manisty C., Treibel T.A., Moon J.C., Valdes A.M., McKnight Á., Altmann D.M., Boyton R. Prior SARS-CoV-2 infection rescues B and T cell responses to variants after first vaccine dose. *Science*, 2021, Vol. 372, no. 6549, pp. 1418-1423.

17. Sette A., Crotty S. Adaptive immunity to SARS-CoV-2 and COVID-19. *Cell*, 2021, Vol. 184, no. 4, pp. 861-880.
18. Sridhar D., Gurdasani D. Herd immunity by infection is not an option. *Science*, 2021, Vol. 371, no. 6526, pp. 230-231.
19. 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, no. 7867, pp. 421-425.
20. Wolszczak-Biedrzycka B., Bieñkowska A., Dorf J. Assessment of post-vaccination antibody response eight months after the administration of BNT162b2 vaccine to healthcare workers with particular emphasis on the impact of previous COVID-19 infection. *Vaccines*, 2021, Vol. 9, no. 12, pp. 1508-1811.

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

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

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, Director, Research Institute of Clinical Immunology, 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

Zaitseva N.S., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Clinical Immunology and Allergology, Rostov State Medical University, Rostov-on-Don, Russian Federation

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

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 26.03.2022
Принята к печати 20.04.2022

Received 26.03.2022
Accepted 20.04.2022

ИСХОДЫ СЕПСИСА: НОВЫЙ ВЗГЛЯД НА СТАРЫЕ ПРОБЛЕМЫ

Савочкина А.Ю.¹, Пыхова Л.Р.¹, Абрамовских О.С.¹,
Четвернина Е.А.¹, Полторак А.Е.²

¹ ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Челябинск, Россия

² ГБУЗ «Челябинская областная клиническая больница», г. Челябинск, Россия

Резюме. Инфекции представляют собой распространенную проблему со здоровьем у людей всех возрастов. Обычно в ответ на инфекцию развивается местная реакция, и лечение не требуется. Однако иногда реакция на инфекцию неадекватна и может привести к дисфункции органа; это состояние, известное как сепсис. Патофизиология сепсиса многофакторная, и в развитии патологических процессов, сопутствующих сепсису, иммунная система принимает самое непосредственное участие. Дисрегуляторные нарушения при сепсисе могут наблюдаться в частности со стороны работы иммунной системы и непосредственно врожденного иммунитета, так как именно он является первой линией защиты нашего организма. Нейтрофильным гранулоцитам в настоящее время отводится важная роль в развитии и поддержании воспалительных процессов, что обусловлено продукцией ими различных медиаторов воспаления. При этом на разных стадиях патогенеза иммунные факторы и механизмы выступают как в качестве генератора и исполнителя реакций повреждения, так и как основные составляющие защитных реакций организма. Неконтролируемый выброс эндогенных медиаторов воспаления, индуцируемый микроорганизмами, и недостаточность механизмов, ограничивающих их повреждающее действие, являются взаимопотенцирующими причинами органной дисфункции. Следовательно, дисфункция иммунной системы может развиваться и углубляться в процессе реализации любой неадекватной стратегии реагирования организма на воздействие инфекционного возбудителя. Целью исследования стало изучение спектра микроорганизмов, уровня нейтрофильных внеклеточных ловушек (НВЛ), PAD4, IL-6, IL-8 и их корреляций у больных с сепсисом и септическим шоком в зависимости от исхода заболевания. В исследование включены 44 пациента с сепсисом и септическим шоком и 20 условно здоровых доноров. У пациентов проводили забор цельной периферической крови из локтевой вены в динамике с момента постановки диагноза до исхода. Проведены микробиологические и иммунологические исследования. Полученные данные были обработаны в статистическом пакете SPSS Statistic 23.0. Развитие септических состояний сопровождается существенным изменением уровня исследуемых иммунологических показателей (НВЛ, IL-6, IL-8 и PAD4), токсичность ферментов лизосом и метаболитов кислорода, присутствующих в нейтрофильных внеклеточных ловушках, ведет к повреждению эндотелия, появлению очагов внутрисосудистого воспаления, что наряду с действием микроорганизмов и их токсинов приводит к развитию полиорганной недостаточности и наступлению смерти, высокие значения которых, вероятнее всего, приведут к летальному исходу.

Ключевые слова: сепсис, септический шок, нейтрофильные внеклеточные ловушки, PAD4, *Acinetobacter baumannii*, IL-6, IL-8

Адрес для переписки:

Пыхова Любовь Романовна
ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный
медицинский университет» Министерства
здравоохранения РФ
454092, Россия, г. Челябинск, ул. Воровского, 64.
Тел.: 8 (904) 307-50-09.
E-mail: lyubov_pykhova@mail.ru

Address for correspondence:

Pykhova Lubov R.
Chelyabinsk Regional Clinical Hospital
454092, Russian Federation, Chelyabinsk, Vorovsky str., 64.
Phone: 7 (904) 307-50-09.
E-mail: lyubov_pykhova@mail.ru

Образец цитирования:

А.Ю. Савочкина, Л.Р. Пыхова, О.С. Абрамовских,
Е.А. Четвернина, А.Е. Полторак «Исходы сепсиса:
новый взгляд на старые проблемы» // Медицинская
иммунология, 2022. Т. 24, № 3. С. 641-646.
doi: 10.15789/1563-0625-OOS-2323
© Савочкина А.Ю. и соавт., 2022

For citation:

A.Yu. Savochkina, L.R. Pykhova, O.S. Abramovskikh,
E.A. Chetvernina, A.E. Poltorak "Outcomes of sepsis: a new
look at old problems", Medical Immunology (Russia)/
Meditsinskaya Immunologiya, 2022, Vol. 24, no. 3,
pp. 641-646.
doi: 10.15789/1563-0625-OOS-2323
DOI: 10.15789/1563-0625-OOS-2323

OUTCOMES OF SEPSIS: A NEW LOOK AT OLD PROBLEMS

Savochkina A.Yu.^a, Pykhova L.R.^a, Abramovskikh O.S.^a,
Chetvernina E.A.^a, Poltorak A.E.^b

^a South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

^b Chelyabinsk Regional Clinical Hospital, Chelyabinsk, Russian Federation

Abstract. Infections represent a common health problem in people at any age. Usually, a local reaction develops in response to the infection, and intensive treatment is not required. However, sometimes the response to infection is inadequate and may lead to organ dysfunction; such condition is defined as septic state. The pathophysiology of sepsis is multifactorial, and the immune system is directly involved in development of pathological processes accompanying septic conditions. Dysregulatory disorders in sepsis may be observed, in particular, those affecting immune system and, immediately, innate immunity, which presents the first line of immune defense. Currently, neutrophilic granulocytes are considered important players in development and maintenance of inflammatory processes, which is due to their ability to produce various inflammatory mediators. At the same time, at different stages of pathogenesis, immune factors and mechanisms act both as a generating factors and effectors of damage reactions, as well as the main components of the defense responses. Uncontrolled release of endogenous inflammatory mediators induced by microorganisms, and lack of damage-limiting mechanisms mutually synergize when promoting the organ dysfunction. Hence, dysfunction of the immune system may develop and deepen upon any inappropriate strategy of response to distinct infectious pathogen. The aim of our study was to assess the spectrum of microorganisms, levels of neutrophilic extracellular traps (NVL), PAD4, IL-6, IL-8 and their correlations in the patients with sepsis and septic shock, depending on the outcome of the disease. The study included 44 patients with sepsis and septic shock, and 20 apparently healthy donors. Peripheral blood samples were taken from the ulnar vein serially in dynamics, from the moment of diagnosis to clinical outcome. Microbiological and immunological studies have been carried out. The obtained data were processed with "SPSS Statistic 23.0" software. Development of septic conditions was found to be accompanied by a significant changes in the levels of studied immunological parameters (NVL, IL-6, IL-8 and PAD4). Toxicity of lysosomal enzymes and oxygen metabolites present in neutrophilic extracellular traps leads to endothelial damage, appearance of focal intravascular inflammation, which, along with damaging effects of microorganisms and their toxins, leads to development of organ failure and onset. High burden of these factors is most likely to cause lethal outcomes.

Keywords: sepsis, septic shock, neutrophil extracellular traps, PAD4, *A. baumannii*, IL-6, IL-8

Сепсис является одной из самых обсуждаемых проблем современной медицины. Это связано, прежде всего, с увеличением частоты его возникновения и высокой смертностью, достигающей даже в ведущих клиниках 40% при сепсисе и 80-90% при септическом шоке [18].

Начиная с 1991 и до 2016 года трижды менялись представления о диагностических критериях и определении понятия сепсис. Согласно новым дефинициям (Sepsis-3, 2016 год) сепсис необходимо рассматривать не как синдром системной воспалительной реакции в ответ на инфекцию, а как угрожающую жизни дисфункцию, причиной которой является дисрегуляторный ответ организма на инфекцию [17]. Несмотря на то, что постоянно появляются новые методические и клинические рекомендации, изменение концепции сепсиса не позволяет окончательно преодолеть существующие трудности ранней постановки диагноза и оценки эффективности лечения [11].

В настоящее время признано, что сепсис включает в себя раннюю активацию как про-, так и противовоспалительных реакций [14] наряду с такими изменениями, как сердечно-сосудистые, нейрональные, вегетативные, гормональные,

биоэнергетические, метаболические, коагуляционные [8, 12, 16], и все они имеют прогностическое значение [17]. Неконтролируемый выброс эндогенных медиаторов воспаления, индуцируемый микроорганизмами, и недостаточность механизмов, ограничивающих их повреждающее действие, являются взаимопотенцирующими причинами органной дисфункции. И, несмотря на то, что предложено множество механизмов, объясняющих связь иммунной дисрегуляции с полиорганной недостаточностью, до сих пор патогенетический механизм их взаимосвязи при сепсисе остается неясным [13]. При сепсисе наблюдается иммунная дисрегуляция, в которой участвуют все звенья как врожденного, так и адаптивного иммунитета. В основе сепсиса лежит синдром системного воспаления с неконтролируемым выбросом цитокинов. В настоящее время среди цитокинов наиболее распространенными биомаркерами сепсиса являются интерлейкины 6 и 8. По современным данным интерлейкин-6 (IL-6) является одним из важнейших медиаторов острой фазы воспаления и выступает как диагностический маркер [7], а интерлейкин-8 (IL-8) — одним из основных хемокинов, стимулирующих

миграцию нейтрофилов, моноцитов и лимфоцитов в очаг воспаления [4].

Нейтрофильным гранулоцитам — основным клеткам врожденного иммунитета — в настоящее время отводится важная роль в развитии и поддержании воспалительных процессов, что обусловлено, в первую очередь, продукцией ими различных медиаторов воспаления [3]. Помимо способности к фагоцитозу и дегрануляции нейтрофилы обладают способностью образовывать внеклеточные структуры. Эти структуры получили название «нейтрофильные внеклеточные ловушки» (Neutrophil Extracellular Traps, NETs или НВЛ) [10]. Нейтрофильные ловушки — один из важных механизмов противоинфекционной защиты при сепсисе, биологическая роль которого не менее важна, чем способность к фагоцитозу и секреции медиаторов. В ранее опубликованных нами работах было показано достоверное увеличение НВЛ у септических больных с летальным исходом на первые [2] и последние сутки [5].

При изучении механизмов образования нейтрофильных внеклеточных ловушек было установлено, что процесс образования НВЛ, прежде всего, требует активации пептидиларгининдеиминазы 4 (PAD4) под действием НАДФ-оксидазы, опосредованной посредниками с активными формами кислорода [15]. PAD4 представляет собой кальций-зависимый фермент, который катализирует превращение пептидиларгинина в пептидил-цитруллин. PAD4 локализован в цитоплазме моноцитов, Т- и В-клеток, нейтрофилов, эозинофилов и натуральных киллеров и может перемещаться в ядро после активации клеток [9]. Изменение уровня PAD4 при сепсисе не изучалось.

Исход сепсиса зависит от особенностей ответа иммунной системы макроорганизма и характера микробной флоры. Вид микроорганизма, вызывающий септические состояния, является важным фактором, определяющим не только клиническое течение, но и исход, а резистентность возбудителя к антибактериальным препаратам имеет и огромное социально-экономическое значение [1].

Исходя из вышеизложенного, **целью нашего исследования** стало изучение спектра микроорганизмов уровня НВЛ, PAD4, IL-6, IL-8 и их корреляций у больных с сепсисом и септическим шоком в зависимости от исхода заболевания.

Для решения поставленных задач за период с 2014 по 2019 годы проведено обследование 44 пациентов с сепсисом и септическим шоком, находившихся на лечении в отделении реанимации и интенсивной терапии ГБУЗ «Челябинская областная клиническая больница». Возраст пациентов варьировал от 19 до 78 лет, средний возраст составил 54,9 лет. Из 44 пациентов было 24 мужчины и 20 женщин. У пациентов проводили забор цельной периферической крови из локтевой вены в динамике с момента постановки диагноза до исхода. Обследуемые в зависимости от исхода были

разделены на две группы: в 1-ю группу (n = 25) включены пациенты с благоприятным исходом, во 2-ю группу (n = 19) — пациенты с неблагоприятным (летальным) исходом, контрольную группу составили условно здоровые доноры (n = 20). Анализ всех изучаемых показателей был проведен ретроспективно на первые и третьи сутки.

Микробиологическая диагностика клинического материала проводилась на базе лаборатории клинической микробиологии ГБУЗ «Челябинская областная клиническая больница» при помощи автоматизированной системы BacT/ALERT3D60 (BioMerieux, Франция). Идентификацию и определение чувствительности выделенных микроорганизмов проводили с помощью микробиологического анализатора VITEK®2 Compact (BioMerieux, Франция). Для определения чувствительности к антимикробным препаратам грамотрицательных, грамположительных микроорганизмов, дрожжеподобных грибов применялись одноразовые карты, используемые с приборами серии VITEK®2.

Иммунологические исследования проводили на базе НИИ иммунологии и на кафедре микробиологии, вирусологии, иммунологии и клинической лабораторной диагностики ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России. Уровень PAD4 определяли с помощью набора фирмы производства Wuhan Fine Biotech Co., Ltd (Китай) на автоматическом иммуноферментном анализаторе ChemWell 2910 (Awareness Technology, Inc., США). Этот набор основан на «сэндвич»-варианте иммуноферментного анализа.

Концентрации IL-6 и IL-8 определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа с использованием коммерческих тест-систем производства АО «Вектор Бест» (Россия) на автоматическом иммуноферментном анализаторе ChemWell 2910 (Awareness Technology, inc., США). Метод определения уровня IL основан на трехстадийном «сэндвич»-варианте твердофазного иммуноферментного анализа с применением моно- и поликлональных антител к исследуемым интерлейкинам.

Определение и подсчет НВЛ осуществляли по следующей методике: 1) из цельной периферической крови готовили мазок на обезжиренном предметном стекле; 2) фиксировали мазок 96%-ным этиловым спиртом, далее подсушивали мазок на воздухе; 3) фиксированный препарат окрашивали по методу Романовского-Гимзе и высушивали на воздухе; 4) учет проводили с помощью светового микроскопа, в котором внеклеточная ДНК представлена тонкими фиолетово-красными нитями, занимающими пространство, в 2-3 раза превосходящее диаметр неизмененного лейкоцита; 5) проводили подсчет следующих морфологических групп: 1-я группа объединяет клетки с сегментированным ядром, 2-я группа включает клетки с U- или S-образным ядром, 3-я группа — это клетки с недифференцированным ядром, и к 4-й группе относят свободнолежащие

красно-фиолетовые волокна, представляющие собой нити ДНК; определяли процентное содержание каждой морфологической единицы на 100 структур. На данную методику получен патент № 2715557 «Способ обнаружения внеклеточной ДНК в цельной периферической крови» [6].

Полученные данные были обработаны в статистическом пакете SPSS Statistic 23.0. Различия между группами выявляли с помощью критерия Манна–Уитни и считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Для описания полученных данных использовали медиану (Me) и квартили ($Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$). Корреляционный анализ проводили методом ранговой корреляции по Спирмену.

Результаты микробиологического исследования показали, что из 44 пациентов грамположительная флора, представленная *Staphylococcus epidermidis*, была идентифицирована у 2 пациентов, грамотрицательные микроорганизмы — у 12, в том числе у 8 пациентов — с благоприятным исходом, у 4 — с неблагоприятным исходом. Среди грамотрицательных микроорганизмов у пациентов, независимо от исхода, преобладал *Acinetobacter baumannii*. У 30 пациентов высеивалась смешанная флора — как грамположительные, так и грамотрицательные микроорганизмы. Спектр возбудителей при смешанной инфекции у пациентов с благоприятным исходом был представлен *Klebsiella pneumoniae* (62,5%), *Acinetobacter baumannii* (50,00%), *Enterococcus faecium* (43,75%), *Enterococcus faecalis* (25%), *Escherichia coli* (18,75%), *Staphylococcus aureus* (18,75%), *Pseudomonas aeruginosa* (12,5%), *Staphylococcus hominis* и *Staphylococcus haemolyticus* в одинаковом проценте случаев (6,25%).

Этиологическая структура смешанной инфекции при летальном исходе была представлена в основном *Acinetobacter baumannii* (53,33%), *Escherichia coli* (46,6%), *Klebsiella pneumoniae* (40%), *Enterococcus faecium* (30,3%), *Pseudomonas aeruginosa* (20%), *Enterococcus faecalis* (20%).

При анализе полученных данных установлено, что иммунологические показатели при сепсисе достоверно отличаются от аналогичных показателей группы контроля, независимо от суток проведения исследования и исхода заболевания. При анализе иммунологических показателей больных с сепсисом регистрируются следующие изменения — на первые сутки у больных с неблагоприятным исходом регистрируется значимое увеличение уровней IL-6 и IL-8 относительно показателей больных с благоприятным исходом, а к 3-м суткам — еще и увеличение PAD4, а также количество внеклеточных сетей. Данные представлены в таблице 1.

При проведении корреляционного анализа выявлены прямые корреляционные связи между уровнями PAD4, НВЛ и PAD4 у пациентов с благоприятным исходом. У больных с неблагоприятным исходом установлено, что уровень PAD4 коррелирует с уровнями IL-6, IL-8.

Данные представлены в таблице 2.

На основании полученных данных можно сделать заключение, что высокие уровни изучаемых иммунологических показателей (НВЛ, IL-6, IL-8 и PAD4), которые регистрируются на первые сутки заболевания и существенно не снижаются в динамике, вероятнее всего приведут к летальному исходу. Можно предположить, что гиперактивация иммунной системы, чрезмерное образование

ТАБЛИЦА 1. ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ У БОЛЬНЫХ С СЕПСИСОМ С БЛАГОПРИЯТНЫМ И НЕБЛАГОПРИЯТНЫМ ИСХОДОМ, Me ($Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$)

TABLE 1. IMMUNOLOGICAL PARAMETERS IN PATIENTS WITH SEPSIS WITH A FAVORABLE AND UNFAVORABLE OUTCOME, Me ($Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$)

Показатели, единицы Indicators, units	Контрольная группа Control group n = 20	Пациенты с благоприятным исходом Patients with a favorable outcome n = 25		Пациенты с неблагоприятным исходом Patients with poor outcome n = 19	
		1-е сутки 1 st day	3-и сутки 3 rd day	1-е сутки 1 st day	3-и сутки 3 rd day
НВЛ, отн. кол-во NET, rel. number	1,5 (0,25-2,00)	18,5* (10,00-27,25)	18,0* (10,5-32,0)	22,0* (14,0-34,0)	37,0* ** (24,0-51,0)
IL-6, пг/мл IL-6, pg/ml	21,9 (19,98-23,90)	77,3* (32,5-174,7)	58,7* (32,65-90,85)	256,1* ** (129,2-398,4)	206,1* ** (77,60-327,73)
IL-8, пг/мл IL-8, pg/ml	17,2 (15,58-18,11)	61,8* (34,68-89,50)	50,7* (21,83-89,12)	133,0* ** (80,33-254,74)	135,8* ** (75,91-217,03)
PAD4, нг/мл PAD4, ng/ml	0,9 (0,45-1,21)	34,6* (26,8-53,4)	28,0* (25,00-36,05)	35,7* (28,5-39,0)	34,6* ** (28,8-51,8)

Примечание. * – статистически значимые отличия по сравнению с группой контроля, $p < 0,05$; ** – статистически значимые отличия по сравнению с группой больных с благоприятным исходом, $p < 0,05$.

Note. *, statistically significant differences compared to the control group, $p < 0.05$; **, statistically significant differences in comparison with the group of patients with a favorable outcome, $p < 0.05$.

ТАБЛИЦА 2. КОРРЕЛЯЦИОННЫЕ СВЯЗИ МЕЖДУ PAD4 И ИММУНОЛОГИЧЕСКИМИ ПОКАЗАТЕЛЯМИ У ПАЦИЕНТОВ С СЕПСИСОМ

TABLE 2. CORRELATION LINKS BETWEEN PAD4 AND IMMUNOLOGICAL PARAMETERS IN PATIENTS WITH SEPSIS

Показатель Indicator	Коэффициент корреляции (ρ) Correlation coefficient (ρ)	p
Пациенты с благоприятным исходом Patients with a favorable outcome (n = 25)		
PAD4, 1-е сутки – НВЛ, 1-е сутки PAD4, 1 st day – NET, 1 st day	0,401	0,047
PAD4, 3-и сутки – PAD4, 1-е сутки PAD4, 3 rd day – PAD4, 1 st day	0,814	< 0,001
Пациенты с неблагоприятным исходом Patients with poor outcome (n = 19)		
PAD4, 1-е сутки – IL-6, 1-е сутки PAD4, 1 st day – IL-6, 1 st day	0,457	0,049
PAD4, 1-е сутки – IL-8, 3-е сутки PAD4, 1 st day – IL-8, 3 rd day	-0,483	0,036

сетей ДНК, содержащих различные медиаторы воспаления, нарушение регуляции фагоцитарной реакции биологически активными веществами (нейромедиаторами, гормонами, простагландинами, биогенными аминами, пептидами и др.) вызывают локальные аутоиммунные реакции с повреждением тканей, а токсичность ферментов

лизосом и метаболитов кислорода, присутствующих в нейтрофильных внеклеточных ловушках, приводит к повреждению эндотелия, появлению очагов внутрисосудистого воспаления, что наряду с действием микроорганизмов и их токсинов инициирует развитие полиорганной недостаточности и наступление летального исхода.

Список литературы / References

1. Голуб И.Е., Сорокина Л.В., Нетесин Е.С. Сепсис: определение, диагностическая концепция, патогенез и интенсивная терапия: Учебное пособие. Иркутск: ИГМУ, 2015. 47 с. [Golub I.E., Sorokina L.V., Netesin E.S. Sepsis: definition, diagnostic concept, pathogenesis and intensive care: a study guide]. Irkutsk: Irkutsk State Medical University, 2015. 47 p.
2. Долгушин И.И., Торопова Л.Р., Савочкина А.Ю., Абрамовских О.С., Привалова Г.Р. Оценка функциональной активности нейтрофилов периферической крови у больных с сепсисом на первые сутки после постановки диагноза // Российский иммунологический журнал, 2015. Т. 9, № 18. С. 22-23. [Dolgushin I.I., Toropova L.R., Savochkina A.Yu., Abramovskikh O.S., Privalova G.R. Determination of the functional activity of peripheral blood neutrophils from septic patients on first day of diagnostics. *Rossiyskiy immunologicheskii zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2015, Vol. 9, no. 18, pp. 22-23. (In Russ.)]
3. Долгушин И.И., Торопова Л.Р., Савочкина А.Ю., Абрамовских О.С., Четвернина Е.А., Полторак А.Е. Динамика изменения показателей функциональной активности нейтрофилов у больных сепсисом с неблагоприятным исходом // Российский иммунологический журнал, 2017. Т. 11 (20), № 2. С. 295-296. [Dolgushin I.I., Toropova L.R., Savochkina A.Yu., Abramovskikh O.S., Chetvernina E.A., Poltorak A.E. Dynamics of changes functional parameters of neutrophils in septic patients with a favorable outcome. *Rossiyskiy immunologicheskii zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2017, Vol. 11 (20), no. 2, pp. 295-296. (In Russ.)]
4. Меняйло М.Е., Малащенко В.В., Шмаров В.А., Газатова Н.Д., Мелашенко О.Б., Гончаров А.Г., Селедцова Г.В., Селедцов В.И. Интерлейкин-8 способен поддерживать провоспалительную активность моноцитов (макрофагов) человека // Гены и Клетки, 2018. Т. XIII, № 1. С. 65-69. [Menyailo M.E., Malashchenko V.V., Shmarov V.A., Gazatova N.D., Melashchenko O.B., Goncharov A.G., Seledtsova G.V., Seledtsov V.I. Interleukin-8 is able to promote pro-inflammatory activity of human monocytes (macrophages). *Geny i Kletki = Genes and Cells*, 2018, Vol. XIII, no. 1, pp. 65-69. (In Russ.)]
5. Савочкина А.Ю., Пыхова Л.Р., Абрамовских О.С., Полторак А.Е., Четвернина Е.А. Сравнительный анализ показателей функциональной активности нейтрофилов периферической крови у больных с сепсисом в зависимости от исхода // Российский иммунологический журнал, 2018. Т. 12, № 21. С. 407-411. [Savochkina A.Yu., Pykhova L.R., Abramovskikh O.S., Poltorak A.E., Chetvernina E.A. Comparative analysis of the indicators of the functional activity of neutrophils peripheral blood in patients with sepsis depending on the exodus. *Rossiyskiy immunologicheskii zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2018, Vol. 12, no. 21, pp. 407-411. (In Russ.)]
6. Савочкина А.Ю., Пыхова Л.Р., Абрамовских О.С., Четвернина Е.А., Полторак А.Е. Способ обнаружения внеклеточной ДНК в цельной периферической крови: Патент № 2715557 С1 Российская Федера-

ция, МПК G01N 33/48, G01N 1/30, G06M 11/00. Способ обнаружения внеклеточной ДНК в цельной периферической крови: № 2019119629: заявл. 24.06.2019; опубл. 02.03.2020. [Savochkina A.Yu., Pykhova L.R., Abramovskikh O.S., Chetvernina E.A., Poltorak A.E. Method for detection of extracellular dna in whole peripheral blood: patent. 2020. No. 2715557.]

7. Akchurin O., Patino E., Dalal V., Meza K., Bhatia D., Brovender S., Zhu Y., Cunningham-Rundles S., Perelstein E., Kumar J., Rivella S., Mary E. Choi Interleukin-6 contributes to the development of anemia in juvenile CKD. *Kidney Int. Rep.*, 2019, Vol. 4, no. 3, pp. 470-483.

8. Angus DC., van der Poll T. Severe sepsis and septic shock. *N. Engl. J. Med.*, 2013, Vol. 369, no. 9, pp. 840-851.

9. Anzilotti C., Pratesi F., Tommasi C., Migliorini P. Peptidylarginine deiminase 4 and citrullination in health and disease. *Autoimmun. Rev.*, 2010, Vol. 9, no. 3, pp. 158-160.

10. Brinkmann V., Reichard U., Goosmann C., Fauler D., Uhlemann Y., Weiss DS., Weinrauch Y., Zychlinsky F. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*, 2004, Vol. 303, pp. 1532-1535.

11. de Jong E., van Oers J.A., Beishuizen A., Vos P., Vermeijden W.J., Haas L.E., Loef B.G., Dormans T., van Melsen G.C., Kluiters Y.C., Kemperman H., van den Elsen M.J., Schouten J.A., Streefkerk J.O., Krabbe H.G., Kieft H., Kluge G.H., van Dam V.C., van Pelt J., Bormans L., Otten M.B., Reidinga A.C., Endeman H., Twisk J.W., van de Garde E.M.W., de Smet A.M.G.A., Kesecioglu J., Girbes A.R., Nijsten M.W., de Lange D.W. Efficacy and safety of procalcitonin guidance in reducing the duration of antibiotic treatment in critically ill patients: a randomised, controlled, open-label trial. *Lancet Infect. Dis.*, 2016, Vol. 16, no. 7, pp. 819-827.

12. Deutschman C.S., Tracey K.J. Sepsis: current dogma and new perspectives. *Immunity*, 2014, Vol. 40, no. 4, pp. 463-475.

13. Ghnawa Y.G., Fish M., Jennings A., Carter M.J., Shankar-Hari M. Goodbye SIRS? Innate, trained and adaptive immunity and pathogenesis of organ dysfunction. *Med. Klin. Intensivmed. Notfmed.*, 2020, Vol. 115, pp. 10-14.

14. Hotchkiss R.S., Monneret G., Payen D. Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy. *Nat. Rev. Immunol.*, 2013, Vol. 13, no. 12, pp. 862-874.

15. Rai G. A Book: NETosis: Immunity, pathogenesis and therapeutics drug development. ELSEVIER, 2019. eBook ISBN: 9780128163795.

16. Singer M., de Santis V., Vitale D., Jeffcoate W. Multiorgan failure is an adaptive, endocrine-mediated, metabolic response to overwhelming systemic inflammation. *Lancet*, 2004, Vol. 364, no. 9433, pp. 545-548.

17. Singer M., Deutschman C.S., Seymour C.W., Shankar-Hari M., Annane D., Bauer M., Bellomo R., Bernard G.R., Chiche J.-D., Cooper Smith C.M., Hotchkiss R.S., Levy M.M., Marshall J.C., Martin G.S., Opal S.M., Rubenfeld G.D., van der Poll T., Vincent J.-L., Angus D.C. The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (Sepsis-3). *JAMA*, 2016, Vol. 315, no. 8, pp. 801-810.

18. Shankar-Hari M., Phillips G.S., Levy M.L., Seymour C.W., Liu V.X., Deutschman C.S., Angus D.C., Rubenfeld G.D., Singer M.; Sepsis Definitions Task Force. Developing a new definition and assessing new clinical criteria for septic shock: for the third international consensus definitions for sepsis and septic shock (Sepsis-3). *JAMA*, 2016, Vol. 315, no. 8, pp. 775-787.

Авторы:

Савочкина А.Ю. — д.м.н., профессор кафедры микробиологии, вирусологии, иммунологии и клинической лабораторной диагностики ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Челябинск, Россия

Пыхова Л.Р. — старший лаборант центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Челябинск, Россия

Абрамовских О.С. — д.м.н., профессор кафедры микробиологии, вирусологии, иммунологии и клинической лабораторной диагностики ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Челябинск, Россия

Четвернина Е.А. — старший преподаватель кафедры микробиологии, вирусологии, иммунологии и клинической лабораторной диагностики ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Челябинск, Россия

Полторак А.Е. — врач-хирург хирургического отделения № 1 ГБУЗ «Челябинская областная клиническая больница», г. Челябинск, Россия

Authors:

Savochkina A. Yu., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Microbiology, Virology, Immunology and Clinical Laboratory Diagnostics, South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

Pykhova L. R., Senior Laboratory Assistant, Central Research Laboratory, South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

Abramovskikh O. S., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Microbiology, Virology, Immunology and Clinical Laboratory Diagnostics, South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

Chetvernina E. A., Senior Lecturer, Department of Microbiology, Virology, Immunology and Clinical Laboratory Diagnostics, South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

Poltorak A. E., Operating Surgeon, Department of Surgery No. 1, Chelyabinsk Regional Clinical Hospital, Chelyabinsk, Russian Federation

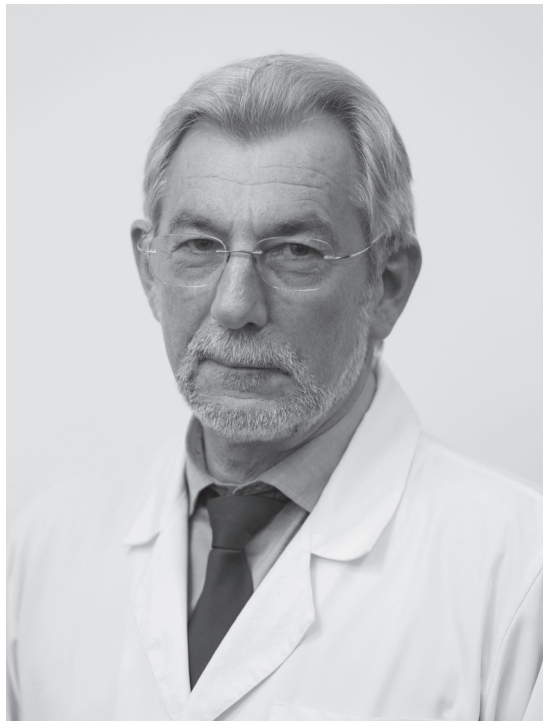
Поступила 01.04.2021

Принята к печати 07.11.2021

Received 01.04.2021

Accepted 07.11.2021

ВИТАЛИЙ ВАСИЛЬЕВИЧ ЗВЕРЕВ



Зверев Виталий Васильевич — академик РАН, доктор биологических наук, профессор, научный руководитель Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», заведующий кафедрой микробиологии, вирусологии и иммунологии им. академика А.И. Воробьева Института общественного здоровья им. Ф.Ф. Эрисмана ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовского университета), лауреат двух премий Правительства Российской Федерации в области науки и техники.

В.В. Зверев — один из ведущих ученых нашей страны в области вирусологии, вакцинологии, молекулярной биологии, генетики вирусов, биологической безопасности, прекрасный организатор медицинской науки, опытный педагог и воспитатель научных кадров.

После окончания в 1975 г. лечебного факультета Волгоградского государственного медицинского института трудовую деятельность Виталий Васильевич начал в должности младшего научного сотрудника в Научно-исследовательском институте прикладной микробиологии Главмикробиопрома в г. Оболенске Московской области (1975-1979) и в Институте молекулярной генетики АН СССР (1979-1985). В 1985 г. Виталий Васильевич

успешно защитил кандидатскую диссертацию по теме «Особенности репликации и структуры ДНК малых колициногенных плазмид».

Последующая научная деятельность В.В. Зверева связана с Научно-исследовательским институтом вирусных препаратов РАМН, где он прошел путь от старшего научного сотрудника до директора института. Фундаментальные научные исследования В.В. Зверева посвящены изучению механизмов взаимодействия вирусов с клеткой, изучению молекулярно-биологической структуры и регуляции экспрессии генов рецепторов вирусов, структуры и функции вирусных белков. Результаты научных исследований были обобщены в докторской диссертации «Структура гена CD4-рецептора и изучение антивирусного действия рекомбинантных форм CD4», защищенной в 1995 г.

В 1999 г. он был избран членом-корреспондентом РАМН, в 2002 — академиком РАМН. С 1997 г. по 2006 г. В.В. Зверев возглавлял Научно-исследовательский институт вирусных препаратов РАМН, а после реорганизации Научно-исследовательского института вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова в форме присоединения к нему Института вирусных препаратов им. О.Г. Анджапаридзе возглавлял до 2018 г. ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова. С 2018 г. по настоящее время В.В. Зверев — научный руководитель Института.

Зверев В.В. — автор более 400 научных трудов, из них 17 книг и монографий, 18 авторских свидетельств и патентов, 12 учебников и 4 методические рекомендации. Под его руководством и при научном консультировании выполнены и успешно защищены 4 докторских и 10 кандидатских диссертаций.

Большое внимание в своей научной работе В.В. Зверев уделяет прикладным аспектам медицинской науки. Целый ряд его исследований посвящен приоритетным разработкам в области биотехнологии. Под его руководством и при непосредственном участии разработано и внедрено в практику отечественного здравоохранения 26 диагностических и противовирусных препаратов.

В.В. Зверев один из авторов первой национальной программы борьбы против ВИЧ-инфекции. При его непосредственном участии Институт первым в 1985 г. начал интенсивные исследования по созданию СПИД-диагностикума, и уже к середине 1986 г. были созданы и внедрены в практику здравоохранения первые отечественные тест-системы для скрининга и подтверждения ВИЧ-инфекции. За цикл работ «Разработка и организация производства новых высокоэффективных средств диагно-

стики ВИЧ-инфекции и гепатитов А, В, С» в 1998 г. В.В. Звереву присуждена премия Правительства Российской Федерации в области науки и техники.

За цикл работ «Разработка, научное обоснование и внедрение системы защиты населения Российской Федерации от новых биологических угроз» в 2006 г. присуждена вторая премия Правительства Российской Федерации в области науки и техники (2006).

Академик РАН В.В. Зверев активно участвует в работе Российской академии наук, входит в состав Президиума РАН. В.В. Зверев проводит большую научно-организационную работу. Он является заместителем председателя Всероссийского научно-практического общества микробиологов, эпидемиологов и паразитологов; председателем научного совета по комплексной проблеме медицины «Вакцинология»; председателем проблемной комиссии «Корь, паротит, краснуха»; главным редактором журнала «Микробиология, эпидемиология и иммунобиология»; членом редакционной коллегии журнала «Вопросы вирусологии», председателем диссертационного совета Института, членом экспертного совета GAVI, членом Правительственной комиссии по биологической и химической безопасности.

В.В. Зверев большое значение придает организации научно-методической и практической помощи учреждениям здравоохранения и населению. Успешно осуществляется деятельность консультативно-поликлинического отделения Института, специалисты которого оказывают высококвалифицированную медицинскую помощь жителям Москвы и Московского региона и которое является в первую очередь базой для научных исследований и внедрения новых технологий в практику здравоохранения.

В настоящее время научные исследования, руководимые академиком РАН В.В. Зверевым, посвящены важнейшим приоритетным направлениям современной медицины — изучению клеточных и молекулярных механизмов врожденного и адаптивного иммунитета при бактериальных и вирусных инфекциях, совершенствованию национального календаря прививок РФ и созданию отечественных вакцинных препаратов, разработке и усовершенствованию методов диагностики (в том числе экспресс-диагностики) и мониторинга патологий различной этиологии, а также созданию иммунобиологических препаратов против наиболее распространенных инфекционных заболеваний.

Виталий Васильевич принимает активное участие в разработке иммунотерапевтического подхода, основанного на использовании вакцинных штаммов вирусов в качестве онколитических агентов для элиминации опухолевых клеток, в исследованиях по совершенствованию методов молекулярной диагностики и экологического мониторинга вирусных инфекций, разработке технологий получения вакцины против вирусов группы герпеса, а также ассоциированной вакцины против кори, паротита, краснухи и ветряной оспы. В круг научных интересов В.В. Зверева входят исследования по оценке профилактической и терапевтической эффективности противовирусных препаратов, разработке экспериментальных моделей для изучения эффективности препаратов.

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-1 β 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-1 β 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

Абакушина Е.В.	481	Закурская В.Я.	629	Михайловский Н.В.	481	Сульимова Т.Б.	527
Абрамовских О.С.	641	Заморина С.А.	491	Мурашкин Н.Н.	587	Сухарева Ю.В.	539
Андреева И.И.	629	Зурочка А.В.	507	Нестерова И.В.	553	Тараканов В.А.	553
Афлитонов М.А.	539	Иванов Р.А.	587	Пасова И.А.	481	Татаурщикова Н.С.	519
Баранова О.П.	573	Иванов С.А.	481	Петричук С.В.	587	Тетерин Ю.В.	553
Барова Н.К.	553	Илькович М.М.	573	Полторак А.Е.	641	Тимганова В.П.	491
Безрукова Е.В.	539	Камелева А.А.	519	Пыхова Л.Р.	641	Тотоян Арег А.	573, 629
Бережанский П.В.	519	Каприн А.Д.	481	Радыгина Т.В.	587	Ужвийок С.В.	491
Березкина М.Э.	463	Кибалина И.В.	597	Раев М.Б.	491	<u>Федоскова Т.Г.</u>	519
Бочкова М.С.	491	Ковалев М.А.	507	Русанова А.С.	519	Фефелова Е.В.	597
Варюшина Е.А.	539	Ковалева С.В.	553	Рыбачук В.А.	481	Харитонов М.В.	629
Василькова А.И.	519	Козлов И.Г.	527	Савлевич Е.Л.	527	Хотко А.А.	587
Воробейчиков Е.В.	539	Козлова М.В.	527	Савочкина А.Ю.	641	Цыбиков Н.Н.	597
Гапонов А.М.	527	Константинова Т.В.	481	Самойлович М.П.	433	Чапурин В.Н.	553
Гельм Ю.В.	481	Кореневский А.В.	463	Сельков С.А.	463	Четвернина Е.А.	641
Герг Т.Н.	463	Котенко А.В.	597	Серебрякова М.К.	573	Чудилова Г.А.	553
Гривцова Л.Ю.	481	Кравченко Э.В.	539	Сесь Т.П.	573	Чумоватов Н.В.	455
Григорьева И.Н.	519	Кудрявцев И.В.	573	Сизякина Л.П.	629	Шабалдин А.В.	605
Гутина Е.В.	491	Купцова Д.Г.	587	Симбирцев А.С.	539	Шардина К.Ю.	491
Давуд Али А.	617	Лазарева Н.М.	573	Синицкая А.В.	605	Шмулевич С.А.	605
Давыдова Е.В.	507	Летяева О.И.	519	Синявин С.А.	463	Эргешов А.Э.	455
Добренькая А.Е.	519	Любимов А.В.	491	Смирнов И.В.	433		
Еремеев В.В.	455	Любимов Д.С.	629	Соколов Д.И.	463		
Зайцева Н.С.	629	Лягуша Д.Э.	553	Столбовая А.Ю.	433		

ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

аллергическая реакция	598	микобактерии	455	табак	455
аллергическое воспаление	520	молекулы адгезии	520	типирование	508
аллогенная трансплантация	492	моноклеарные клетки	482	трофобластический	
ангиогенез	464	мутации	617	туберкулез	455
антитела к МІСА/В	434	нейтрофилы	540	фенотип	464, 482
атопический дерматит	598	нейтрофильные внеклеточные		фидерные клетки	482
аутоантитела	598	ловушки	641	фитопрепарат	528
аутоиммунный процесс	598	нейтрофильные гранулоциты	554	хронический полипозный	
белки МІСА/В	434	никотин	455	риносинусит	540
бронхиальная астма	520	обострение астмы	520	цитокиновый профиль	492
вирус	520	острый перитонит	554	экссудативные поражения	
врожденные пороки сердца	605	патогенез	598	пространства Рейнке	508
вульгарный псориаз	588	поствакцинальный иммунитет	630	эктонклеотидазы	588
гексапептид	554	постинфекционный иммунитет	630	эндотелий	464
гены TLR	605	провоспалительные		ЭпиВакКорона	630
гипосаливация	528	цитокины IL-1β	528	<i>Acinetobacter baumannii</i>	641
гипотиреоз	528	пролиферация	464, 482	CD39	588
дети	554, 588	противовоспалительный		CD73	588
дисфункции	554	интерлейкин IL-10	528	COVID-19	617, 630
дифференцировка Т-хелперов	574	противоопухолевый иммунитет	434	IL	605
естественные киллеры	464	проточная цитометрия	574	IL-1β	540
заболевания легких	455	растворимые МІСА/В	434	IL-6	528, 641
иммунный ответ	455, 464	ремдесивир	617	IL-8	540, 641
иммуномодулирующая терапия	554	респираторный эпителий	540	NK-клетки	434, 482
ИФА	482	РНК-зависимая РНК-полимераза	617	NKG2D-рецептор	434
коллаген	598	саркоидоз	574	PAD4	641
короткие пептиды	492	сепсис	641	Т-хелперы	574, 588
крысы Wistar	492	септический шок	641	Т-хелперы 17	574
ксеростомия	528	сиаладенит	528	Th17.1	574
культивирование	482	сиаладеноз	528	TNF	528, 605
лейкоцитарная инфильтрация	540	слюна	528	β1-гликопротеин	492
лимфоциты	508	слюнные железы	528		
миграция	464	спайковый белок	617		

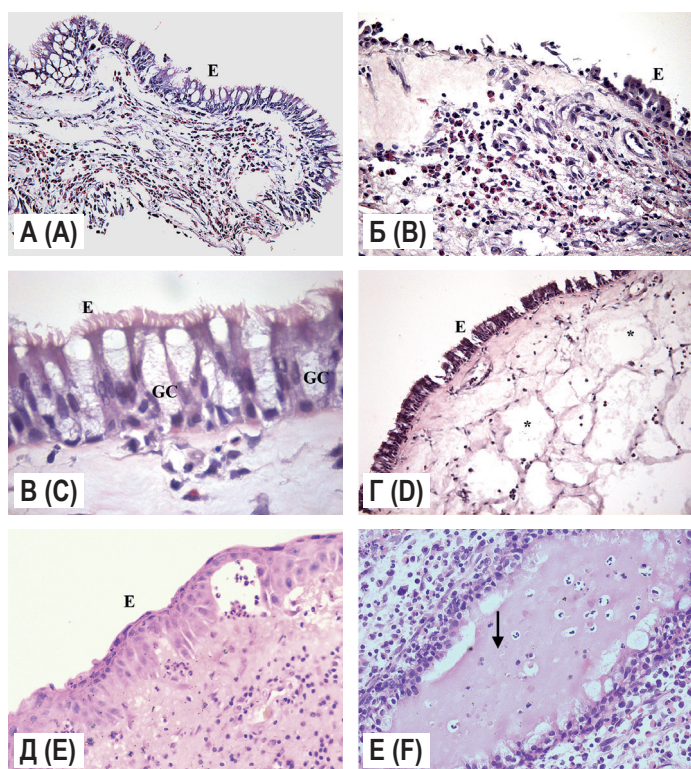


Рисунок 2. Микрофотографии срезов полипозной ткани при ХПРС и ХПГРС

Примечание. А, Б – легкая форма ХПРС, общий вид разных участков полипа. В – легкая форма ХПРС, эпителий, GC – бокаловидные клетки. Г – резистентная форма ХПРС, общий вид, звездочки – отек в соединительнотканной строме полипа. Д – ХПГРС, общий вид. Е – ХПГРС, строма полипа, стрелка – полость, заполненная гноем. Е – эпителий, покрывающий полип. Окраска гематоксилином-эозином. Оригинальное увеличение: А ×160, Б, Г ×320, Д, Е ×640, В ×1600.

Figure 2. Microphotographs of sections of polyposis tissue in CRSwNP and CPRSwNP

Notes. A, B, mild form of CRSwNP, general view of different parts of the polyp. C, mild form of CRSwNP, epithelium; GC, goblet cells. D, resistant form of CRSwNP, general view; asterisks, edema in the connective tissue stroma of the polyp. E, CPRSwNP, general view; F, CPRSwNP, polyp stroma; arrow, cavity filled with pus. E, epithelium covering the polyp. Stained with hematoxylin-eosin. Original magnification: A ×160, B, D ×320, E, F ×640, C ×1600.

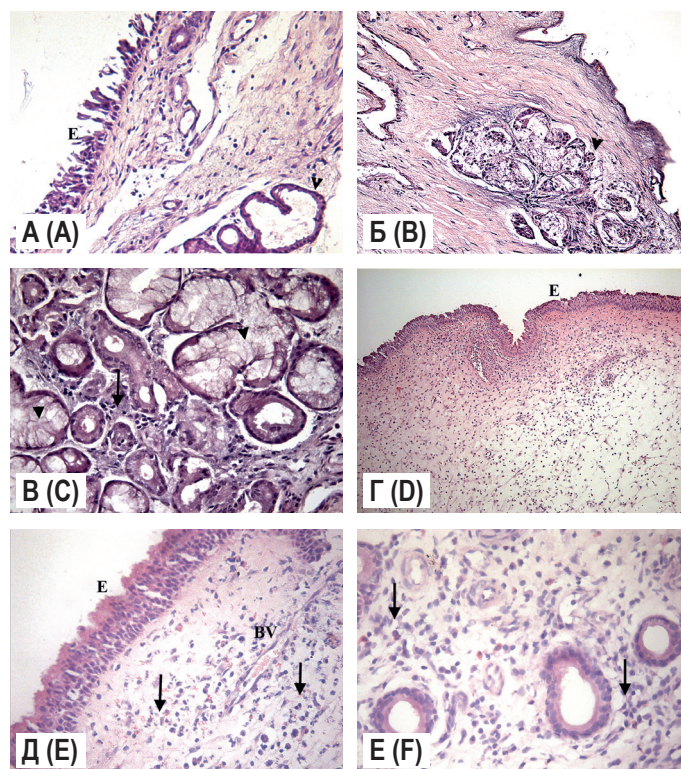


Рисунок 3. Микрофотографии срезов полипозной ткани при ХПРС + БА

Примечание. А – ХПРС + БА, общий вид, головки стрелок – железы. Б – ХПРС + БА, участок среза с фиброзом, головки стрелок – железы. В – ХПРС + БА, слизистые железы. Г – астматическая триада, общий вид. Д – астматическая триада, метаплазия эпителия, стрелки – субэпителиальная лейкоцитарная инфильтрация. Е – астматическая триада, стрелки – лейкоцитарная инфильтрация в строме полипа. Е – эпителий, покрывающий полип, BV – кровеносный сосуд. Окраска гематоксилином-эозином. Оригинальное увеличение: А, Б ×320, Г ×160, В, Д, Е ×640.

Figure 3. Microphotographs of sections of polyposis tissue in CRSwNP + BA

Note. A, CRSwNP + BA, general view; arrow heads, mucous glands. B, CRSwNP + BA, section with fibrosis; arrow heads, mucous glands. C, CRSwNP + BA, mucous glands; arrows, leukocyte infiltration in the stroma of the polyp. D, asthmatic triad, general view. E, asthmatic triad, epithelial metaplasia; (arrows) subepithelial leukocyte infiltration. F, asthmatic triad; arrows, leukocyte infiltration in the stroma of the polyp. E, epithelium covering the polyp; BV, blood vessel. Stained with hematoxylin-eosin. Original magnification: A, B ×320, D ×160, C, E, F ×640.

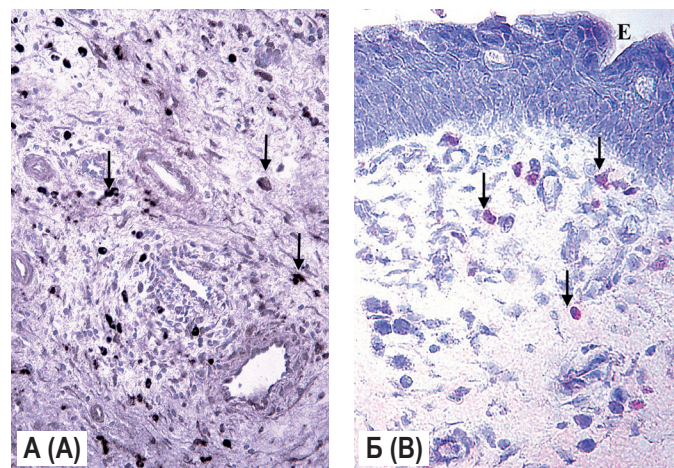
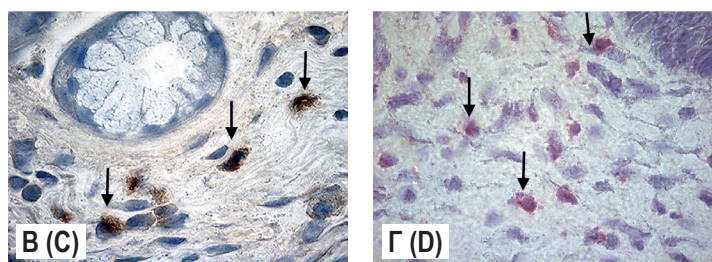


Рисунок 4. Иммуногистохимическое выявление IL-1β и IL-8 на срезах полипозной ткани при ХПРС

Примечание. А, Б – IL-1β (стрелки) в полипозной ткани (Б) при астматической триаде и (В) при ХПРС + БА. Б, Г – IL-8 (стрелки) в полипозной ткани при ХПРС. Е – эпителий, покрывающий полип. Ядра клеток докрашены гематоксилином Карацци. Оригинальное увеличение: А ×320, Б ×640, В, Г ×1600.

Figure 4. Immunohistochemical detection of IL-1β and IL-8 on sections of nasal mucosa and polyposis tissue in CRSwNP

Note. A, C, IL-1β (arrows) in polyposis tissue (B) in asthmatic triad and (C) in CRSwNP + BA. B, D, IL-8 (arrows) in polyposis tissue in CRSwNP. E, epithelium covering the polyp. Cell nuclei were stained with Carazzi's hematoxylin. Original magnification: A ×320, B ×640, C, D ×1600.



ПОДПИСНОЙ ИНДЕКС:
РОСПЕЧАТЬ – 83030
ПРЕССА РОССИИ – 42311

